

**EFEK TERAPI *Virgin Coconut Oil* (VCO) HASIL PENGASAMAN JERUK
NIPIS TERHADAP HEWAN MODEL NOSOKOMIAL OLEH
Staphylococcus aureus DILIHAT DARI EKSPRESI IL-8
DAN HISTOPATOLOGI JARINGAN KULIT**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan



Oleh:
GALUH PURNAWATI
145130100111005

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Efek Terapi *Virgin Coconut Oil* (VCO) Hasil Pengasaman Jeruk Nipis terhadap Luka Insisi Hewan Model Nosokomial oleh *Staphylococcus aureus* dilihat dari Ekspresi IL-8 dan Histopatologi Jaringan Kulit

Oleh :

GALUH PURNAWATI

145130100111005

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 24 Agustus 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Sri Murwani, drh, MP
NIP. 19630101 198903 2 001

drh. Fajar Shodiq P, M. Biotech
NIP. 1987050 120 1504 100 I

Mengetahui,

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Galuh Purnawati

NIM : 145130100111005

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

Efek Terapi *Virgin Coconut Oil* (VCO) Hasil Pengasaman Jeruk Nipis terhadap Luka Insisi Hewan Model Nosokomial oleh *Staphylococcus aureus* dilihat dari Ekspresi IL-8 dan Histopatologi Jaringan Kulit

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 24 Agustus 2018
Yang Menyatakan,

GALUH PURNAWATI
NIM. 145130100111005

Efek Terapi *Virgin Coconut Oil* (VCO) Hasil Pengasaman Jeruk Nipis terhadap Luka Insisi Hewan Model Nosokomial oleh *Staphylococcus aureus* dilihat dari Ekspresi IL-8 dan Histopatologi Jaringan Kulit

ABSTRAK

Penyembuhan luka pada operasi bedah dapat mengalami infeksi akibat penanganan dan kondisi yang kurang tepat. Infeksi nosokomial merupakan infeksi yang berkembang di rumah sakit dan menyerang penderita dalam masa perawatan akibat transmisi berupa mikroba patogen seperti *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* dapat bersifat *multi drug resisten*, oleh karena itu dibutuhkan terapi dari bahan alam untuk mempercepat kesempuhan luka. *Virgin Coconut Oil* (VCO) merupakan bahan alternatif penyembuhan luka karena mengandung asam lemak bersifat antibakteri, mempercepat proliferasi fibroblast dan antiinflamasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek terapi VCO pada hewan model nosokomial terhadap ekspresi interleukin 8 (IL-8) dan histopatologi jaringan kulit. VCO dibuat dengan pengasaman jeruk nipis 1 %. Sebanyak 20 ekor hewan coba berupa *Mus musculus* galur BALB/c, jantan, berat $24,2 \pm 30,0$ gram, umur 8 minggu dibagi menjadi 5 kelompok. Model infeksi nosokomial berupa luka insisi dijahit dengan benang terkontaminasi *S. aureus* 10^5 CFU/ml. Kelompok terdiri atas kontrol negatif (dijahit aseptis), kontrol positif (infeksi tanpa terapi), dan 3 kelompok infeksi diterapi dengan perbedaan frekuensi pemberian VCO yaitu P1(1x/hari), P2 (2x/hari) serta P3(3x/hari) selama 7 hari terapi. Variabel penelitian adalah ekspresi IL-8 diukur dengan metode *flowcytometry* dan dianalisa dengan uji *one way ANOVA* dilanjutkan uji BNJ ($p < 0,05$), histopatologi jaringan kulit diamati dengan pewarnaan HE yang dianalisa secara deskriptif. Hasil terbaik menunjukkan bahwa pemberian VCO 1x/hari mampu menurunkan ekspresi IL-8 tertinggi dan peradangan jaringan kulit luka menurun pada luka insisi model nosokomial. Kesimpulan penelitian ini VCO hasil pengasaman jeruk nipis dapat digunakan sebagai alternatif terapi luka infeksi nosokomial oleh *S. aureus*.

Kata kunci : Luka, Histopatologi jaringan, IL-8, *Virgin Coconut Oil*

Effect of Virgin Coconut Oil Treatment (VCO) Acid Regeneration Result of Animal Incision Injury Nosocomial Model by *Staphylococcus aureus* seen from Ekspression of IL-8 and Histopathology of Skin Tissue

ABSTRACT

Wound healing in surgical operation can be infection due to improper handling and conditions. Nosocomial infection was an infection that develops in the hospital and was cured during the treatment due to the transmission of pathogenic microbes such as *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* can be *multi-drug resistant*, therefore it requires therapy from natural materials to accelerated wound compliance. *Virgin Coconut Oil* (VCO) was a substitute for wounds because it contains antibacterial, accelerated the proliferation of fibroblasts and anti inflammation. This study aims to determine the effect of VCO therapy on nosocomial model animals on interleukin 8 (IL-8) expression and skin tissue histopathology. VCO was made by 1% acidified lime. A 20 animal models in the form of *Mus musculus*, BALB / c strain, male, weight 24.2 ± 30.0 grams, age 8 weeks were divided into 5 groups. Model of nosocomial infection were incised wound those sewn with *S. aureus* 10^5 CFU / ml contaminated thread. The group consisted of negative control (aseptic sutures), positive control (infection without therapy), and 3 groups of infections treated with differences in the frequency of VCO administration, as P1 (1x / day), P2 (2x / day) and P3 (3x / day) during 7 days of therapy. The research variable were IL-8 expression measured by *flowcytometry* method and analyzed by *one way ANOVA* test followed by Tukey test ($p < 0.05$), and skin tissue histopathology was observed with HE was analyzed descriptively. The best results showed that administration VCO 1x / day was able to reduce the highest IL-8 expression and repair in wound skin tissue in nosocomial incision wounds. The conclusion of this study is that VCO results from lime acidification can be used as an alternative therapy for wound nosocomial infections by *S. aureus*.

Keywords: Wound, Tissue Histopathology, IL-8, Virgin Coconut Oil

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga SKRIPSI yang berjudul **“Efek Terapi *Virgin Coconut Oil* (VCO) Hasil Pengasaman Jeruk Nipis terhadap Luka Insisi Hewan Model Nosokomial oleh *Staphylococcus aureus* dilihat dari Ekspresi IL-8 dan Histopatologi Jaringan Kulit”** ini dapat terselesaikan.

Penulis mengucapkan terimakasih kepada segenap pihak yang secara langsung maupun tidak langsung telah membantu dalam penyusunan SKRIPSI ini. Ucapan terimakasih terutama kepada:

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
2. Dr. Sri Murwani, drh, M P. selaku dosen pembimbing 1 atas segala bantuan, kesempatan, nasihat, bimbingan, arahan serta dukungan yang diberikan kepada penulis.
3. drh. Fajar Shodiq P, M Biotech selaku dosen pembimbing 2 atas segala bantuan, kesempatan, nasihat, bimbingan, arahan serta dukungan yang diberikan kepada penulis.
4. drh. Indah Amalia Amri, M.Si selaku penguji 1 atas nasihat dan arahan yang diberikan kepada penulis.
5. drh. M. Arfan Lesmana, M.Sc selaku penguji 2 atas nasihat dan arahan yang diberikan kepada penulis.
6. Secara khusus penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada Ibu Kunthi Uningo, almarhum Bapak Joko Utomo, kakak Yuni Karuniawati, Widi kukuh P, Ria F serta keluarga besar yang telah memberikan doa, kasih sayang, dukungan, pengorbanan baik secara moril maupun materil kepada penulis selama belajar di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang.
7. Teman-teman tim SKRIPSWEET yaitu Fitri, Annisa, dan sitmar yang telah memberikan dukungan dan *support* terbaiknya.
8. Sahabat angkatan 2014 terutama kelas A atas segala perhatian, semangat, penghargaan, ajaran, motivasi, dukungan, kebersamaan, dan doa yang telah diberikan dalam meraih cita-cita.

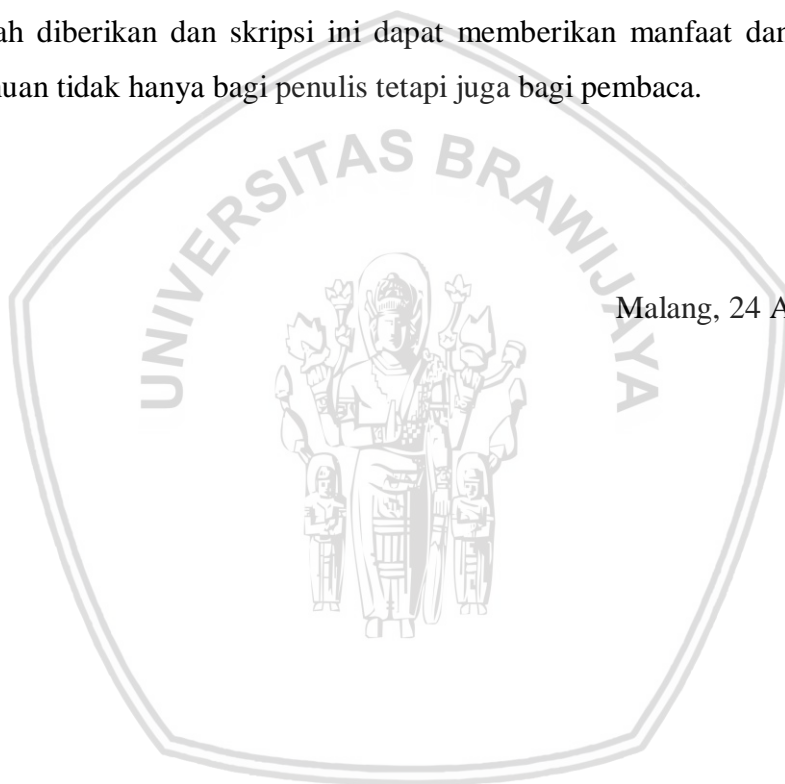
9. Teman-teman “konco kenthel” yaitu Intan, Rida, Sofi, Flora dan Safa yang juga ikut membantu proses pembuatan skripsi dengan cara memberikan doa dan ikut membantu memberikan semangatnya
10. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan SKRIPSI ini yang tidak mungkin penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa penulisan SKRIPSI ini masih jauh dari kesempurnaan, maka saran dan kritik yang konstruktif dari semua pihak sangat diharapkan demi penyempurnaan selanjutnya.

Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan dan skripsi ini dapat memberikan manfaat dan menambah pengetahuan tidak hanya bagi penulis tetapi juga bagi pembaca.

Malang, 24 Agustus 2018

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
COVER	
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	ii
ABSTRAK.....	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG.....	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Kulit	6
2.1.1 Lapisan Kulit	6
2.1.2 Fungsi Kulit	11
2.2 Luka Insisi	12
2.2.1 Jenis- Jenis Luka	13
2.2.2 Proses Penyembuhan Luka.....	14
2.3 Luka Infeksi Nosokomial.....	18
2.4 <i>Staphylococcus aureus</i>	19
2.5 Interleukin- 8 (IL-8).....	20
2.6 Histopatologi Jaringan Kulit	21
2.6.1 Histopatologi Luka Infeksi	21
2. 6.2 Kolagen	23
2.6. 3 Fibroblast.....	23
2.7 <i>Virgin Coconut Oil</i> (VCO).....	23
2.7.2 VCO Hasil Pengasaman Jeruk Nipis	25
2.8 Mencit (<i>Mus musculus</i>)	27
BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	29
3.1 Kerangka Konseptual	29
3.2 Hipotesis Penelitian	33
BAB 4. METODE PENELITIAN.....	34
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	34
4.2 Alat dan Bahan	34
4.3 Tahapan Penelitian	35
4.3.1 Rancangan Penelitian	35
4.3.2 Penetapan Sampel Penelitian	36
4.3.3 Variabel Penelitian	37

4. 4 Prosedur Kerja	37
4.4.1 Persiapan Hewan Coba.....	37
4.4.2 Pembuatan VCO Hasil Pengasaman Jeruk Nipis	38
4.4.3 Pembuatan Suspensi Bakteri	39
4.4.4 Pembutan Benang Terkontaminasi Bakteri <i>S.aureus</i>	40
4.4.5 Pembutan Infeksi Nosokomial pada Benang	40
4.4.6 Terapi VCO	41
4.4.7 Pengambilan Jaringan Kulit	42
4.4.8 Pembuatan Preparat Histopatologi Kulit	42
4.4.9 Pengukuran Kadar Relatif IL-8	43
4.5 Analisis Data	44
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	45
5.1 Pengaruh Pemberian VCO Hasil Pengasaman Jeruk Nipis Terhadap Ekspresi Interleukin-8 Sebagai Penyembuhan Luka Insisi Hewan Model Nosokomial oleh <i>Staphylococcus aureus</i>	49
5.2 Pengaruh Pemberian VCO Hasil Pengasaman Jeruk Nipis Terhadap Histopatologi Kulit sebagai Penyembuhan Luka Insisi Hewan Model Nosokomial oleh <i>Staphylococcus aureus</i>	53
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN	62
6.1 Kesimpulan	62
6.2 Saran	62
DAFTAR PUSTAKA	63
LAMPIRAN	72

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Komposisi Asam Lemak Minyak Kelapa	24
5.1 Rata-rata Presentase Kadar Relatif Interleukin-8	50



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Lapisan Kulit	9
2.2 Gambaran Slide Histogis Kulit	11
2.3 Fase Penyembuhan Luka	14
2.4 Gambaran Histopatologi Infeksi <i>Staphylococcus aureus</i>	22
2.4 Gambaran Histopatologi Penyembuhan Infeksi Bakteri	22
2.6 Morfologi Mencit (<i>Mus musculus</i>)	28
5.1 Gambar Makroskopis Kesembuhan Luka Hari Kedelapan Pasca Operasi...	48
5.2 Histogram rata-rata kadar relatife IL-8 berdasarkan <i>flowcytometry</i> pada masing-masing Kelompok Perlakuan	49
5.3 Gambaran Histopatologi luka insisi kontrol negatif pembesaran 40x, 100x dan 400x menggunakan pewarnaan HE	54
5.4 Gambaran histopatologi kontrol positif pembesaran 40x, 100x dan 400x menggunakan pewarnaan HE	55
5.5 Gambaran histopatologi luka terapi VCO 1x sehari pembesaran 40x, 100x dan 400x menggunakan pewarnaan HE	55
5.6 Gambaran histopatologi luka terapi VCO 2x sehari pembesaran 40x, 100x dan 400x menggunakan pewarnaan HE	56
5.7 Gambaran histopatologi luka terapi VCO 3x sehari pembesaran 40x,100x dan 400x menggunakan pewarnaan HE	56

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Kerangka Operasional Penelitian	70
2. Pembuatan Preparat Histopatologi	71
3. Prosedur Pewarnaan Hematoksilen-Eosin	72
4. Prosedur <i>Flowcytometry</i> untuk IL-8	73
5. Perhitungan Pengenceran <i>Mc. Farland</i>	74
6. Prosedur <i>Flowcytometry</i> untuk IL-8	75
7. Identifikasi Bakteri <i>S.aureus</i> pada Media MSA	76
8. Identifikasi Sensitifitas Bakteri <i>S.aureus</i> pada Media MHA	76
9. Kadar Relatif IL-8 Hasil Uji <i>Flowcytometri</i>	77
10. Hasil Uji Fitokimia	78
11. Hasil Statistika Kadar Relatif IL-8	79

DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
%	: Persen
BNF	: <i>Buffer Neutral Formalin</i>
BNJ	: Beda Nyata Jujur
CXCR	: <i>Chemokine Receptor</i>
EGF	: <i>Epidermal Growth Factor</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
GAG	: <i>Glycoaminoglycans</i>
HE	: <i>Hematoksilen-Eosin</i>
IGF	: <i>Insulin like growth factor</i>
IL-8	: Interleukin-8
MHA	: <i>Mueller Hinton Agar</i>
MRSA	: <i>Methicillin Resistant Staphylococcus aureus</i>
MSA	: <i>Manitol Salt Agar</i>
NA	: <i>Nutrient Agar</i>
NB	: <i>Nutrient Broth</i>
PAMP	: <i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PDGF	: <i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor-B</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor- α</i>
UV	: Ultraviolet
VCO	: <i>Virgin Coconut Oil</i>



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Luka adalah hal yang diperhatikan setelah melakukan pembedahan atau operasi. Luka sengaja pada operasi sengaja dibuat untuk tujuan tertentu dengan menginsisi suatu bagian jaringan. Luka yang ditimbulkan pada saat operasi adalah luka insisi. Luka insisi merupakan luka yang dibuat dengan potongan bersih menggunakan instrumen tajam. Penyembuhan luka pada operasi bedah dapat mengalami gangguan akibat penanganan dan kondisi yang kurang tepat. Salah satu gangguan pada penyembuhan luka adalah infeksi. Infeksi nosokomial merupakan infeksi yang berkembang di rumah sakit dan menyerang penderita dalam masa perawatan yang merupakan akibat dari transmisi berupa mikroba patogen, berasal dari lingkungan rumah sakit dan perangkatnya (Wikansari.,dkk,2012).

Infeksi nosokomial dapat disebabkan oleh beberapa mikroorganisme seperti bakteri kokus gram positif, bakteri gram negatif dan jamur. Bakteri gram positif meliputi *Staphylococcus koagulase* negatif, *Streptococcus vridans* dan *Staphylococcus aureus*. Bakteri gram negatif yaitu *Eschericia coli*, *Klebsiella pneumoniae* dan *Pseudomonas aeruginosa*, sedangkan untuk infeksi oleh jamur yaitu *Candida* sp. dan *Aspergillus* sp (Davey, 2005).

Gejala infeksi nosokomial pada luka operasi membutuhkan beberapa waktu untuk munculnya tanda klinis. Gejala yang muncul dari infeksi ditandai dengan nyeri, pemebengkakan lokal, kemerahan dan panas (Arias, 2009).

Proses penyembuhan luka terbagi atas beberapa fase yaitu fase inflamasi, proliferasi dan maturasi. Kolagen merupakan material penting dalam proses penyembuhan luka. Paparan kolagen *fibriler* ke darah selanjutnya akan menyebabkan agregasi dan aktivasi trombosit serta melepaskan faktor kemotaksis untuk memulai proses penyembuhan luka dan terbentuk ekstraseluler baru. Fase penyembuhan luka tidak terlepas dari peran sitokin pada tubuh (Triyono, 2005).

IL-8 merupakan salah satu sitokin yang berperan pada proses luka. Peningkatan IL-8 ditemukan pada infeksi bakteri maupun virus. IL-8 membantu menarik neutrofil ke tempat infeksi (Ukrowi, 2011). Histopatologi jaringan dapat dilihat dengan melihat proses kesembuhan dan perbaikan jaringan luka. Pengamatan histopatologi dapat dilihat pada lapisan epidermis, dermis dan hipodermis (Suwiti, 2010). Pada proses penyembuhan luka IL-8 sebagai *chemoattractant* akan mengalami penurunan dan setelah terlewati masa inflamasi maka terjadi perbaikan jaringan secara histopatologi berupa peningkatan jumlah lumen pembuluh darah, jumlah makrofag, jumlah fibroblast dan ketebalan kolagen pada luka.

VCO (*Virgin Coconut Oil*) merupakan salah satu minyak nabati yang memiliki banyak khasiat bagi kulit. VCO mengandung asam lemak berupa asam laurat yang memiliki sifat antimikroba (antivirus, antibakteri, dan antijamur) serta mampu melembutkan kulit (Widyandani.,dkk, 2010). VCO dengan perasan jeruk nipis tidak memiliki perbedaan yang signifikan dengan VCO pada umumnya, namun pembuatan VCO ini lebih mudah dan warna lebih bening. Berdasarkan tinjauan pustaka tersebut, oleh karena itu dalam penelitian ini dilakukan studi terapi VCO hasil pengasaman jeruk nipis terhadap luka hewan model nosokomial. Parameter yang dipergunakan dalam rancangan penelitian ini ekspresi IL-8 dan histopatologi

jaringan kulit. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi berupa inovasi pengobatan yang efektif terhadap kesembuhan luka infeksi nosokomial pasca operasi.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah VCO pengasaman jeruk nipis dapat digunakan sebagai terapi luka insisi hewan model nosokomial oleh *Staphylococcus aureus* dengan menurunkan ekspresi IL-8.
2. Apakah VCO pengasaman jeruk nipis dapat digunakan sebagai terapi luka insisi hewan model nosokomial oleh *Staphylococcus aureus* dengan melihat histopatologi jaringan kulit.

1.3 Batasan Masalah

1. Hewan coba yang digunakan yaitu mencit (*Mus musculus*) BALB/c jantan dengan berat 24.2 ± 30.0 g yang berumur 8 minggu (Dai, 2011).
2. Anestesi untuk pembuatan model luka menggunakan kombinasi *Ketamine* HCl (dosis 100 mg/kgBB) dan *Xylazine* (dosis 5 mg/kgBB). Untuk mempermudah injeksi, dilakukan pengenceran *Xylazine* 20 mg/ml sebanyak 0,5 ml dicampur dengan 19,5 ml aqua pro injeksi di dalam vial steril. Selanjutnya, ditambahkan *Ketamine* HCl 100 mg/ml sebanyak 2 ml dicampur dengan 18 ml aqua pro injeksi (Plumb, 2008). Pemberian campuran *Ketamine* HCl – *Xylazine* disuntikkan melalui rute intraperitoneal masing-masing dengan dosis 0.1 ml/10 gBB (Sastrawan, 2016).
3. Pembuatan model luka nosokomial dibuat dengan insisi *longitudinal midline* sepanjang 2,5 cm pada *panniculus carnosus* punggung. Luka dijahit dengan benang silk 4/0 dengan panjang 5 cm yang dikontaminasi bakteri

Staphylococcus aureus (10^5 CFU/ml). Penjahitan dilakukan dengan jarum *tapper* 1/2 GT 35 mm pola *simple continuous suture* secara diagonal pada *panniculus carnosus* punggung (Dai, 2011).

4. *Virgin Coconut Oil* (VCO) diperoleh dari hasil perasan kelapa tua (*Cocos nucifera*) segar karena memiliki kandungan asam lemak yang lebih tinggi. Selanjutnya, dilakukan pengasaman melalui menambahkan perasan jeruk nipis dengan konsentrasi 1% (Qosimah, 2017). Frekuensi terapi VCO yang diberikan yaitu 1 kali dalam sehari, 2 kali dalam sehari dan 3 kali dalam sehari dengan konsentrasi 100% VCO murni.
5. Pengamatan IL-8 dilakukan dengan metode *Flowcytometri* menggunakan sampel kulit (Brubaker., *et al*, 2011).
6. Pengamatan histopatologi jaringan dilakukan dengan pewarnaan *Hematoksilen-Eosin* (HE).
7. Pada penelitian ini analisa data yang diamati yaitu hasil kadar relatif Interleukin 8 dengan uji *one way ANOVA* dan uji lanjutan BNJ (Beda Nyata Jujur) dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) serta gambaran histopatologi jaringan luka dilakukan analisa deskriptif.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui efek terapi minyak VCO hasil pengasaman jeruk nipis pada luka insisi hewan model nosokomial oleh *Staphylococcus aureus* dilihat dari Ekspresi IL-8.
2. Mengetahui efek terapi minyak VCO hasil pengasaman jeruk nipis pada luka insisi hewan model nosokomial oleh *Staphylococcus aureus* dilihat dari histopatologi jaringan kulit.

1.5 Manfaat Penelitian

1. Memperoleh dasar informasi potensi minyak VCO dari hasil pengasaman sebagai terapi luka insisi hewan model nosokomial oleh *Staphylococcus aureus* dilihat dari Ekspresi IL-8 dan histopatologi jaringan kulit
2. Memberi nilai tambah pada minyak VCO dari hasil pengasaman jeruk nipis



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kulit

Kulit merupakan salah satu bagian terluar tubuh. Kulit adalah lapisan atau jaringan terluar tubuh untuk perlindungan dari luar. Dalam tubuh, kulit memiliki berbagai manfaat salah satunya barier pertama pertahanan tubuh dari mikroorganisme. Kulit juga cukup kompleks, elastis dan sensitif, bervariasi pada keadaan iklim, umur, jenis kelamin, ras dan juga bergantung pada lokasi tubuh. Kulit hewan, seperti sapi mengandung kadar air sebesar 64%, protein 33%, lemak 2%, mineral 0,5% dan senyawa lain seperti pigmen 0,05% (Widati.,dkk, 2007).

2.1.1 Lapisan Kulit

Kulit tersusun atas tiga lapisan utama yaitu epidermis, dermis dan hypodermis.

A. Epidermis

Epidermis merupakan lapisan luar kulit yang tipis dan avaskuler. Epidermis merupakan bagian yang memiliki aksesoris seperti rambut, kuku, kelenjar sebacea dan kelenjar keringat. Epidermis berasal dari bagian ektoderm selama embrio (Brown dan Tony, 2005). Epidermis tersusun atas epitel berlapis squamosa, bertanduk dan mengandung sel Langerhans. Epidermis memiliki peran sebagai proteksi barier, organisasi sel, pembelahan dan mobilisasi sel, pigmentasi (melanosit) serta kontak dengan alergen (sel Langerhans). Epidermis juga berperan pada mekanisme penyembuhan luka karena epidermis pada lapisan bagian luar membentuk selaput tersusun dari sel-sel yang mati, lapisan tanduk atau *stratum korneum*, yang terdiri dari protein keratin dan campuran kompleks lipid. Membran

tersebut dapat terkelupas dengan kecepatan yang tetap dan sel-sel akan diganti oleh sel-sel yang lebih dalam, yaitu sel yang masih hidup dari epitel. Dari proses tersebut, lapisan tanduk mempunyai ketebalan yang tetap pada setiap daerah tubuh dengan rata-rata sekitar 0,1 mm. Dengan demikian sifat lapisan epidermis menggambarkan proses keratinisasi yang terjadi secara periodik (Supriyanto dan Lilis, 2010). Lapisan epidermis tersusun atas *stratum- stratum* yang berurutan (**Gambar 2. 1**). Menurut Kalangi (2013) Epidermis terbagi dalam lima lapis sel keratinosit, jika diurutkan dari dalam keluar yakni

1. *Stratum basale*

Stratum basale merupakan lapisan yang berlokasi terdalam dan tersusun atas satu lapis sel yang berderet-deret di atas membran basal dan melekat pada dermis di bawahnya. Sel – sel tersebut berbentuk kuboid atau silindris. Memiliki inti yang besar, dibanding ukuran selnya, dan sitoplasmanya basofilik. Pada *stratum basale* ini biasanya terlihat gambaran mitosis sel, dan sel proliferasinya berperan untuk regenerasi epitel. Sel-sel pada lapisan ini akan bermigrasi ke arah permukaan untuk memasok sel-sel pada lapisan yang lebih superfisial. Pergerakan sel ini dapat dipercepat oleh adanya luka, dan regenerasinya cepat dalam keadaan normal.

2. *Stratum spinosum*

Pada lapisan ini terdiri dari beberapa lapis sel yang cukup besar berbentuk poligonal dengan inti lonjong. Sitoplasma lapisan ini berwarna kebiruan. Jika dilakukan pengamatan dengan pembesaran obyektif 45x, pada dinding sel yang berbatasan dengan sel yang ada di sebelahnya akan terlihat taju-taju yang seolah-olah menghubungkan sel yang satu dengan sel yang lain. Pada taju inilah terletak

desmosom yang dapat merekatkan sel-sel satu dan yang lain. Pada lapisan ini, semakin ke atas bentuk sel semakin gepeng atau squamus.

3. *Stratum granulosum*

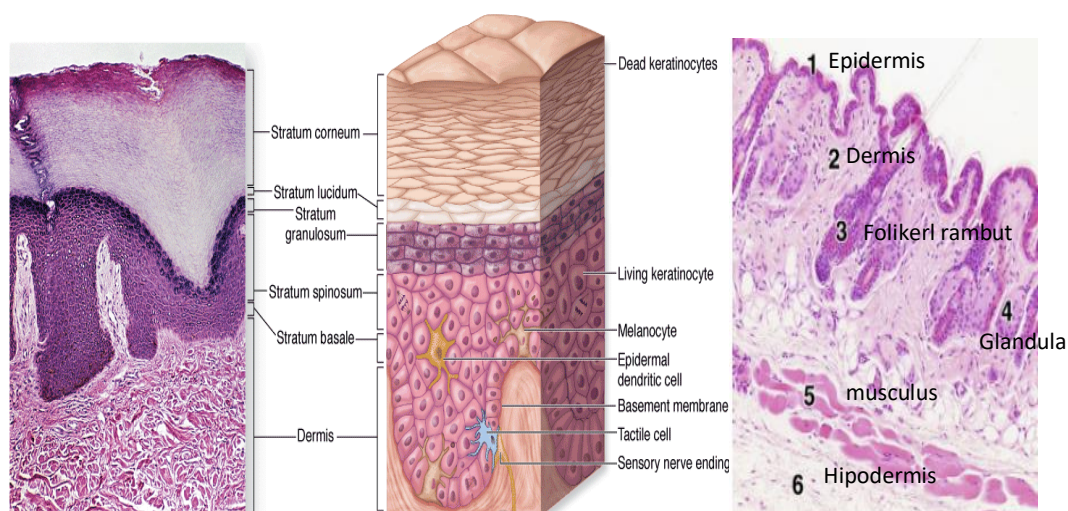
Pada lapisan *Stratum granulosum* tersusun dari 2 hingga 4 lapis sel squamus yang mengandung banyak granula basofilik dan disebut dengan granula keratohialin, dan jika diamati menggunakan mikroskop elektron merupakan partikel amorf yang tak bermembran tetapi dikelilingi ribosom. Mikrofilamen melekat pada permukaan granula lapisan ini.

4. *Stratum lucidum*

Pada lapisan *Stratum lucidum* disusun oleh 2 hingga 3 lapisan sel squamus yang tembus cahaya, dan sedikit eosinofilik. Pada lapisan ini sel-sel tersebut tidak memiliki inti maupun organel. Meskipun memiliki sedikit desmosom, tetapi pada lapisan ini adhesi atau perlekatan tidak terlalu kuat, hal ini mengakibatkan ketika diamati seringkali tampak garis celah yang memisahkan stratum korneum dengan lapisan lain yang terdapat di bawahnya.

5. *Stratum korneum*

Pada lapisan *Stratum korneum* tersusun dari banyak lapisan sel-sel mati, berbentuk pipih dan tidak memiliki inti serta sitoplasmanya digantikan oleh keratin. Sel-sel yang paling permukaan merupakan sisik zat tanduk yang telah tua dan terkelupas.



Gambar 2. 1 Lapisan Kulit (Mescher, 2010) dan Kulit mencit (Henrich, 2004).

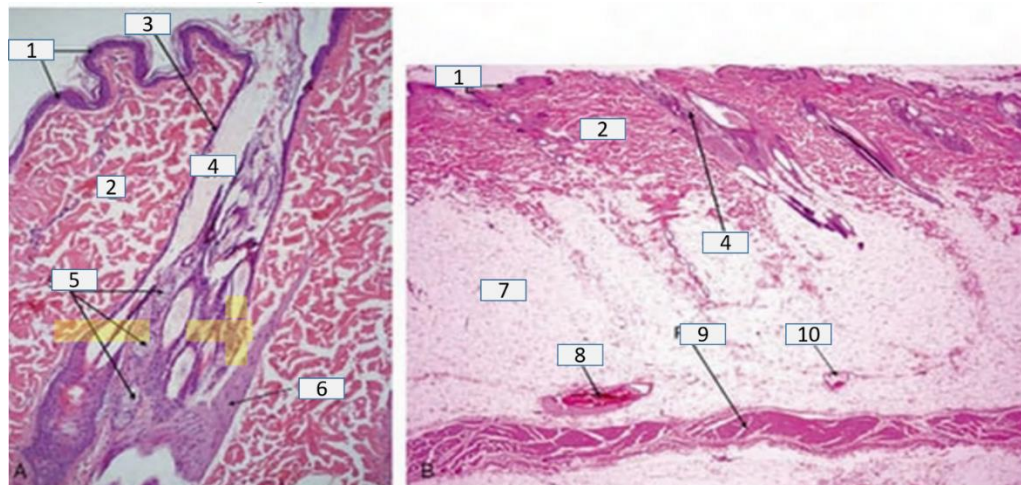
B. Dermis

Lapisan kedua adalah dermis. Dermis merupakan lapisan jaringan ikat yang berada dibawah epidermis dan merupakan bagian yang mendominasi kulit (**Gambar 2.2**). Lapisan dermis dan epidermis saling tertaut melalui penonjolan – penonjolan epidermis kearah bawah atau *rete redge* dan penonjolan dermis kearah atas atau *dermal papillae*. Dermis merupakan anyaman serat – serat kolagen dan serat elastin yang mengakibatkan kontinuitasnya kuat dan elastis. Serat elastin merupakan protein yang tersusun atas mukopolisakarida. Elemen utama dermis adalah fibroblast, sel mast dan makrofag. Fibroblast merupakan matriks jaringan ikat pada dermis. Sel mast merupakan sel yang berada diseluruh bagian dermis dan merupakan sel yang memiliki granula dengan kandungan mediator seperti histamin, protaglandin, leukotrien, serta faktor kemotaksis eosinofil dan neutrofil. Makrofag yaitu sel fagosit berasal dari sumsum tulang, memiliki peran kolektor debris kotoran dan bahan ekstraseluler sel (Brown dan Tony, 2005).

Dermis memiliki banyak kandungan syaraf, limfe, reseptor sensoris dan pembuluh darah. Lapisan dermis tersusun atas 2 bagian yaitu lapisan retikuler dan lapisan papiler. Lapisan papiler mengandung saraf dan pembuluh kapiler yang memelihara epidermis, sementara lapisan retikuler tersusun atas sebuah jaringan ikat yang kuat, mengandung kolagen serta serat yang elastis. Lapisan dermis merupakan struktur penyusun kulit yang berperan pada elastisitas dan kekuatan regang kulit. Kemampuan tersebut dapat melindungi tubuh dari cedera, meretensi air, membantu dalam termoregulasi, dan termasuk reseptor stimuli indrawi (Chu, 2008).

C. Hipodermis

Lapisan ketiga yaitu Hipodermis. Hipodermis merupakan suatu lapisan subkutan di bawah retikularis dermis. Hipodermis tersusun atas jaringan ikat lebih longgar dengan serat kolagen halus dan menyatu dengan bagian dari dermis. Lapisan ini pada bagian tertentu, seperti punggung tangan, memungkinkan gerakan kulit. Pada bagian lain, serat-serat yang masuk ke dermis lebih banyak dan kulit relatif sukar digerakkan. Lemak lebih banyak terkumpul dilapisan ini jika dibandingkan dengan dermis. Lemak subkutan cenderung terkumpul pada bagian tertentu. Pada bagian abdomen dapat mencapai ketebalan 3 cm atau lebih. Lapisan lemak ini disebut *pannikulus adiposus* (Kalangi, 2013).



Gambar 2.2 Gambaran slide histologi pada kulit. 1; epidermis, 2; Dermis, 3; Selubung akar eksterna, 4 ; Komponen Folikel Rambut , 5; kelenjar sebacea, 6; Muskulus arrector pili, 7; Hipodermis , 8; Vena Cutaneus, 9; Panniculus carnosus , 10; Arteri Cutaneus (Pavletic, 2010).

2.2.2 Fungsi Kulit

Fungsi dari kulit antara lain pertahanan tubuh atas lingkungan, pembungkus struktur dan jaringan tubuh, regulasi suhu tubuh, indra peraba, serta sintesis dan penyimpanan vitamin D. Fungsi kulit sebagai proteksi dan keberadaannya di permukaan tubuh menyebabkan kulit rentan terhadap trauma dan terjadinya luka (Angel., *et al*, 2014).

Kulit sebagai pertahanan pertama secara mekanis maupun imunologis pada tubuh. Peran pertama barier tekanan seperti kulit yang menutupi permukaan tubuh. Kulit yaitu lapisan epidermis dengan stratum korneum, keratinosit dan lapisan basal bersifat sebagai barier yang penting, mencegah mikroorganisme dan agen perusak potensial lain masuk ke dalam jaringan yang lebih dalam (Garna, 2001). Sel- sel langerhans dan keratinosit pada kulit akan berperan mempersiapkan ketika terjadi peningkatan antigen eksterna untuk dipresentasikan pada limfosit T yang kemudian meningkatkan respon imun tubuh (Brown dan Tony, 2005).

Kulit sebagai regulasi suhu tubuh dan dehidrasi. Suhu inti tubuh diatur oleh sebuah area di hipotalamus yang sensitif terhadap suhu dan bagian ini dipengaruhi oleh aliran darah yang mengalirinya. Respon kulit terhadap keadaan dingin adalah vasokonstriksi dan mengurangi aliran darah sehingga akan mengurangi transfer panas ke permukaan tubuh. Respon terhadap panas adalah vasodilatasi, peningkatan aliran darah dan pelepasan panas keluar tubuh. Peran kulit sebagai pengatur dehidrasi dilakukan oleh *stratum kornemum* dengan sel – selnya yang saling tumpang tindih dan lemak intraselulernya menghalangi difusi air keluar tubuh (Brown dan Tony, 2005). Menurut Arthur dan John (2006) kulit merupakan pengatur radiator panas, dan aliran darah ke kulit sehingga mekanisme penyaluran panas dari inti tubuh dapat terjadi secara efektif.

Kulit sebagai pembentukan vitamin D. Vitamin D₃ merupakan bentuk inaktiv yang berada pada hewan. Vitamin D atau kolekalsiferol dibentuk di kulit oleh paparan sinar UV pada dehidrokolesterol (Rubenstein., dkk, 2005). Kulit merupakan indra peraba tubuh. Stimulus sebagai rangsangan pada ujung saraf didalam kulit berbeda-beda sesuai ujung saraf yang dirangsang. Reseptor panas, dingin, sakit, nyeri berada pada bagian dermis kulit (Pearce, 2009).

2.2 Luka Insisi

Luka merupakan kerusakan anatomis, kondisi terpisahnya jaringan karena hal tertentu. Dalam dunia kedokteran hewan , luka merupakan kasus yang sering terjadi pada bagian kulit, subkutan maupun otot. Pembuatan luka dalam dunia medis dapat dilakukan untuk tujuan tertentu, seperti pembuatan luka insisi pada operasi atau luka akibat trauma misalnya luka akibat kecelakaan (Mustika., dkk, 2015).

2.2.1 Jenis – jenis Luka

Luka berdasarkan mekanisme cedera diklasifikasikan atas luka kontusi, luka laserasi dan luka insisi. Luka kontusi adalah luka yang disebabkan oleh benda tumpul, umumnya dapat merusak permukaan kulit dan menimbulkan perdarahan atau ekimosis pada suatu jaringan. Luka laserasi yaitu luka yang disebabkan akibat benturan keras dengan benda tumpul. Tepi luka biasanya tidak teratur. Luka insisi adalah luka akibat benda tajam. Dalam dunia medis luka insisi dapat dibuat dengan potongan bersih menggunakan instrument tajam. Contoh luka insisi yaitu luka yang dibuat oleh ahli bedah dalam setiap prosedur operasi. Luka insisi atau luka bedah operasi seringkali menimbulkan infeksi (Suharto, 2017).

Sedangkan klasifikasi luka berdasarkan tingkat kontaminasi luka saat pembedahan terdiri dari luka bersih, luka kontaminasi bersih, luka terkontaminasi, dan luka kotor atau terinfeksi (Rahmawati, 2014). Menurut Anaya dan Delinger (2008) berdasarkan tingkat kontaminasinya luka dibedakan atas

a. Kelas I / Luka bersih

Luka bersih atau *clean wound* yaitu luka bedah yang tidak terjadi infeksi dan inflamasi tidak terjadi proses peradangan (inflamasi) serta tidak menembus *respiratorius*, *traktus gastrointestinalis* dan *traktus urogenitalis*. Luka bersih biasanya menghasilkan luka yang tertutup. Luka bersih lebih baik dikondisikan pada keadaan kering atau ditutup untuk mencegah kontaminasi.

b. Kelas II / Luka bersih terkontaminasi

Luka bersih terkontaminasi atau *Clean-contaminated Wounds*, merupakan luka pembedahan dimana traktus gastrointestinalis dan traktus urogenitalis namun masih dalam kondisi yang terkendali, kemungkinan timbulnya infeksi luka adalah 3% - 11%.

c. Kelas III/ Luka terkontaminasi

Luka terkontaminasi atau *Contaminated Wounds* seperti luka terbuka , luka akibat kecelakaan dan operasi. Pada kasus ini terdapat cairan dari *traktus gastrointestinalis* dan *insisional* yang akut dan inflamasi yang bersifat nonpurulen.

d. Kelas IV / Luka kotor atau infeksi

Luka kotor atau *Dirty or Infected Wounds* terjadi akibat luka trauma dan terbuka dan terkontaminasi oleh mikroorganisme. Luka ini dapat terjadi pasca operasi dan menimbulkan infeksi klinikal. Luka terkontaminasi mengalami inflamasi akut non-purulen.

2.2.2 Proses Penyembuhan Luka

Penyembuhan luka ialah suatu proses yang kompleks dan sistematis. Penyembuhan luka merupakan suatu proses yang kompleks karena adanya kegiatan bioseluler serta biokimia yang terjadi secara berkorelasi. Penggabungan respon vaskuler, aktivitas seluler, dan terbentuknya senyawa kimia sebagai substansi mediator di daerah luka merupakan komponen yang saling terkait pada proses penyembuhan luka . Pada saat terjadi luka, tubuh memiliki mekanisme untuk mengembalikan substansi jaringan yang rusak dengan membentuk struktur baru dan fungsional (Purnama.,dkk, 2017).

Sel radang tersusun oleh leukosit. Leukosit merupakan suatu sistem pertahanan tubuh terhadap infeksi yang terdiri dari sel polimorfonuklear (granuler) dan mononuklear (agranuler). Sel PMN terdiri dari basofil, eosinofil, dan neutrofil. Sedangkan sel MN terdiri dari limfosit, monosit, dan sel plasma. Penyembuhan luka dapat diketahui dengan infiltrasi fibroblast dan penurunan sel radang serta terbentuknya pembuluh kapiler baru (Lostapa, 2016).

Proses penyembuhan luka terdiri atas 4 fase utama yakni fase hemostasis, fase inflamasi, fase proliferasi, dan fase remodeling atau maturasi (Sumbayak, 2016).

1. Fase Homeostasis

Pembuluh darah yang ruptur dengan cepat mengalami konstriksi (penyempitan) dan retraksi (penyusutan) serta reaksi hemostasis setelah terjadinya luka. Hemostasis merupakan suatu interaksi kompleks antara pembuluh darah, trombosit dan protein koagulasi dalam menghentikan perdarahan dengan tetap menjaga aliran darah di pembuluh darah (Chlander, 2005). Pada fase ini mengakibatkan trombosit keluar dari pembuluh darah membentuk sumbat trombosit, dan bersama dengan benang fibrin yang terbentuk perlahan melakukan proses pembekuan darah yang keluar dari pembuluh darah. Setelah terjadi proses pembekuan darah komponen hemostasis akan melepaskan dan mengaktifkan sitokin yang meliputi faktor pertumbuhan epidermis seperti *epidermal growth factor* atau *EGF*, faktor pertumbuhan mirip insulin (*insulin like growth factor* atau *IGF*), faktor pertumbuhan yang berasal dari trombosit yaitu *platelet-derived growth factor* atau *PDGF*, dan faktor pertumbuhan β yang

bertransformasi *beta-transforming growth factor* atau TGF- β . Faktor pertumbuhan dan sitokin dapat berfungsi untuk kemotaksis neutrofil, makrofag, mast sel, sel endotelial dan fibroblast. Fibroblast ini akan berperan membentuk jaringan parut dalam proses penyembuhan luka (Sumbayak, 2016).

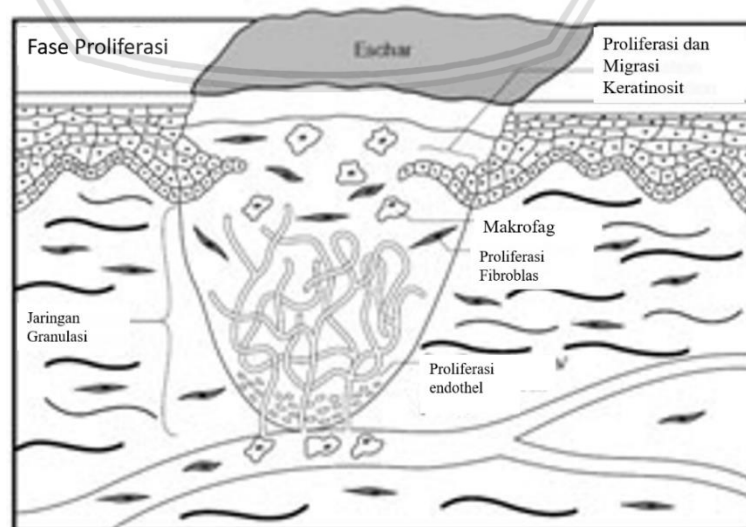
2. Inflamasi

Proses inflamasi dapat terjadi setelah luka hingga hari ke 5. Sel neutrofil merupakan respon sel radang pertama yang ditemukan pada daerah luka, biasanya mulai muncul dalam 24 jam pertama setelah kerusakan, neutrofil tersebut berperan dalam mengeliminasi benda asing, bakteri, sel dan matrik jaringan yang rusak. Sel mast juga memiliki peran penting dalam tahap inflamasi. Sel Mast yaitu sel yang kaya dengan granula berisi berbagai macam enzim, histamin dan berbagai jenis mediator kimia lain yang bertanggung jawab terhadap terjadinya inflamasi di daerah sekitar luka. Bahan aktif yang dilepaskan sel mast akan memicu serangkaian proses yang menyebabkan peningkatan permeabilitas pembuluh darah sehingga sel monosit bisa dengan mudah bermigrasi ke dalam jaringan yang luka (Eming.,dkk, 2007). Sel Monosit dalam darah akan menjadi teraktivasi dan menjadi makrofag setelah 48 jam, yang berperan besar dalam tahap inflamasi penyembuhan luka . Setelah teraktivasi, sel Makrofag akan menghasilkan PDGF, IL-8 dan TGF- β . Sifat fagositik dari Makrofag bertujuan untuk mengeliminasi sel dan matrik yang rusak, Neutrofil yang penuh dengan patogen, benda asing dan sisa bakteri yang masih tersisa.

Adanya *Wound Macrophage* sebagai fagositosis menandakan akhir proses inflamasi dan segera dimulainya proses proliferasi. Pada fase inflamasi ditandai dengan adanya *tumor, rubor, dolor, color, functio laesa* (Kartika, 2015).

3. Proliferasi

Fase proliferasi atau fibroplasi berlangsung dari hari ke-6 sampai 14. Terjadi proleoferasi sel – sel fibroblast yang berasal dari sel mesensim yang belum berdiferensiasi (**Gambar 2.3**). Pada proses ini terjadi pembentukan jaringan granulasi yang terdiri dari sel- sel fibroblast, serat kolagen yang dihasilkan oleh sel fibroblast, deposit sel- sel radang dan kapiler baru hasil angiogenesis. Terjadi pemampatan luka akibat serat – serat kolagen yang mempertautkan tepi luka. Pada tahap ini terjadi proses epitelisasi akibat proses migrasi dan mitosis sel – sel pada *stratum basale* dan keratinosit lain yang terpapar luka seperti sel- sel kelenjar sebacea, kelenjar keringat dan akar rambut ke tengah luka. Seluruh proses tersebut akan berhenti jika semua permukaan telah tertutup epitel (Bisono, 2003).



Gambar 2.3 Fase proliferasi penyembuhan luka (Kartika, 2015)

4. Fase Remodeling

Fase remodeling terjadi dari beberapa minggu hingga dua tahun. Pada fase ini terbentuk suatu kolagen baru yang mengubah bentuk luka serta peningkatan kekuatan jaringan (*tensile strength*). Pada fase ini juga terbentuk jaringan parut (*scar tissue*) 50%- 80% dan memiliki kekuatan yang sama seperti jaringan sebelumnya. Pengurangan bertahap aktivitas seluler and vaskulerisasi jaringan yang mengalami perbaikan (Kartika, 2015).

2.3 Luka Infeksi Nosokomial

Infeksi nosokomial sampai saat ini masih menjadi perhatian di dunia medis. Infeksi nosokomial yaitu infeksi yang berasal atau terjadi di rumah sakit. Infeksi nosokomial disebabkan oleh virus, jamur, parasit; dan bakteri merupakan patogen paling sering pada infeksi nosokomial (Nasution, 2012). Mikroorganisme penyebab infeksi nosokomial meliputi Bakteri seperti *S. aureus* 20%, *Pseudomonas aeruginosa* 16%, *Coagulase-negative Staphylococcus* 15%, *Enterococci*, jamur, *Enterobacter*, dan *Escherichia coli* yang kurang dari 10%. Mikroorganisme infeksi ini dapat hidup dan berkembang di lingkungan rumah sakit, misalnya udara, air, lantai, makanan dan benda-benda peralatan medis maupun non medis (Nugraheni.,dkk, 2012). Infeksi nosokomial dapat terjadi sebagai gangguan sistem imun pasien yang rendah, pemberian obat imunosupresif, obat antimikroba, serta tranfusi darah dalam keadaan tidak steril. Infeksi lokal yang terjadi diawali dengan adanya pembengkakan, kemerahan jaringan setempat, nyeri pada kulit atau sekitar luka atau luka yang terbuka, yang dapat menimbulkan kerusakan jaringan di bagian

bawah otot, serta dapat menyebabkan sepsis (Soedarto, 2016). Penilaian infeksi nosokomial menurut Sabarguna (2007) meliputi :

1. Saat masuk rumah sakit tidak ada tanda gejala atau tidak dalam masa inkubasi infeksi tersebut
2. Infeksi terjadi minimal 3 x 24 jam setelah pasien di rumah sakit
3. Infeksi pada lokasi yang sama tetapi disebabkan oleh mikroorganisme yang berbeda dari sebelumnya.

2.4 *Staphylococcus aureus*

Bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri flora normal yang dapat bersifat invasif dan pathogen pada hewan dan manusia. *S. aureus* merupakan bakteri Gram positif yang berbentuk kokus, non-motil, diameter 0,7-1,2 μm , tersusun dalam kelompok-kelompok yang tidak teratur seperti buah anggur, fakultatif anaerob, dan tidak membentuk spora. Bakteri ini tumbuh pada suhu optimum 37 °C. Koloni pada perbenihan padat berwarna abu-abu hingga kuning keemasan, berbentuk bulat, halus, menonjol, dan berkilau (Hartono, 2002). *S. aureus* memiliki faktor virulensi antigen permukaan, Invasin, toksin degradasi dan koagulase (Peacock *et al.*, 2002 dalam Khusnan; dkk, 2016). Antigen permukaan seperti protein A, adhesin, hemagglutinin, glikoprotein, dan fibronektin berperan membantu kolonisasi dalam jaringan hospes. Sedangkan invasin seperti leukocidin, kinase, dan hyaluronidase berperan membantu bakteri menyebar dalam jaringan. Toksin degradasi berperan merusak membran yaitu hemolysin, leukotoxin, dan leukocidin. Kemudian enzim koagulase bersama Esterase dapat meningkatkan aktivitas penggumpalan, sehingga terbentuk deposit fibrin pada permukaan sel bakteri yang dapat menghambat fagositosis.

Methicilin Resistant Staphylococcus aureus adalah golongan bakteri gram positif yang resisten terhadap antibiotik methicilin. MRSA merupakan bakteri flora normal yang terdapat di kulit. Pada awalnya *S. aureus* merupakan bakteri yang dikenal sebagai suatu patogen infeksi yang terjadi di rumah sakit (*Hospital Acquired Methicilin Resistant Staphylococcus aureus*). Uji sensitifitas difusi digunakan dengan cakram antibiotik (Nurkusuma, 2009).

Respon imun yang terjadi sebagai akibat adanya invasi dari bakteri yaitu *S.aureus* sebagai antigen ketika masuk ke dalam tubuh akan dieliminasi oleh neutrofil dan makrofag sebagai perannya pada sistem imun innate. Neutrofil merupakan pertahanan awal yang penting terhadap infeksi. Dalam keadaan normal, hanya sebagian kecil neutrofil yang ditemukan dalam sirkulasi dan sebagian besar neutrofil disimpan di sumsum tulang. Dalam responnya terhadap infeksi, neutrofil pada sumsum tulang akan dilepaskan dan mengontrol invasi pathogen dalam perifer melalui fagositosis, agen oksidatif, *enzymatic digestion dan formaton of extracellular traps* (Mufidah, 2017).

2.5 Interleukin 8

Setelah terjadinya luka, jaringan yang telah rusak akan menghasilkan mediator vasoaktiv dan faktor kemotaktik melalui proses koagulasi dan jalur faktor kemotaksis serta sel parenkim aktif pada luka. Interleukin- 8 merupakan salah satu sitokin yang berperan dalam penyembuhan luka (Prabakti, 2005). Akumulasi dari neutrofil leukosit pada sebuah jaringan merupakan penanda dari inflamasi, dan reaksi pertahanan tubuh dari suatu infeksi. IL-8 dihasilkan sebagai prekursor dari 99 asam amino dan disekresikan setelah pembelahan dari sinyal sequensi. IL-8 pada

awalnya dikenali sebagai protein pengaktiv neutrophil berdasarkan efek kemotaksis dan pelepasan granula enzim (Baggiolini, 1992).

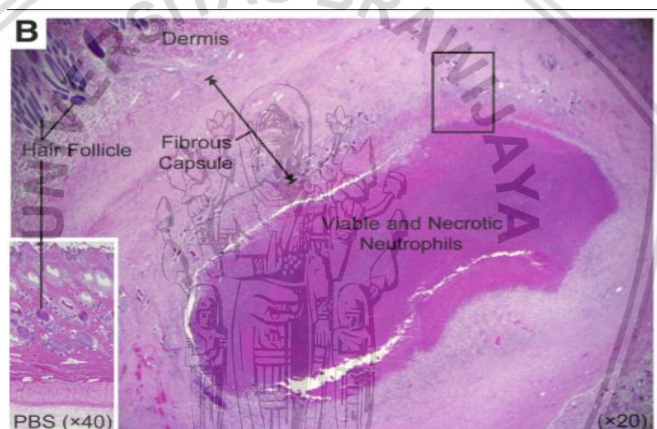
IL-8 merupakan mediator inflamasi yang dikenal sebagai CXCL8, memiliki massa molekul 6-8 kDa. Peran utama pada inflamasi yaitu pengerahan neutrophil dan bertanggung jawab pada migrasi kemotaksis, aktivasi monosit, limfosit, basofil, dan eosinofil pada rute inflamasi. IL-8 dapat ditemukan diantara bentukan monomeric dan dinomeric serta keduanya diperlukan dalam aktivasi neutrophil walaupun dengan gerak yang berbeda. Selanjutnya ikatan dimer ke glikosaminoglikans (GAGs) lebih efisien dan ikatan ke endothelial sebaik ikatan CXCR1/2 pada neutrophil. Heparin ditemukan sebagai GAG yang diasosiasikan dengan IL-8 untuk membuat neutrophil kemotaksis. IL-8 dapat mengikat kedua CXCR1 dan CXCR 2, bersamaan dengan hal tersebut sinyal kaskade akan teraktivasi dan G protein juga teaktivasi. Setelah protein G teraktivasi maka akan menginisiasi MAPK dan IL-8 mengaktivasi mekanisme sinyal kompleks neutrophil dan adhesi molekul ekstraseluler (Turner., *et al*, 2014). Ekspresi IL-8 dapat mengalami peningkatan ketika jaringan kulit mengalami kerusakan akibat luka. IL-8 bersama mediator inflamasi lainnya meningkatkan ekspresi faktor adhesi pada sel endotel untuk mengaktifkan diapedesis sel radang ke lokasi luka untuk melawan agen infeksi yang mengontaminasi luka (Iocono, 2000).

2.6 Histopatologi Jaringan Kulit

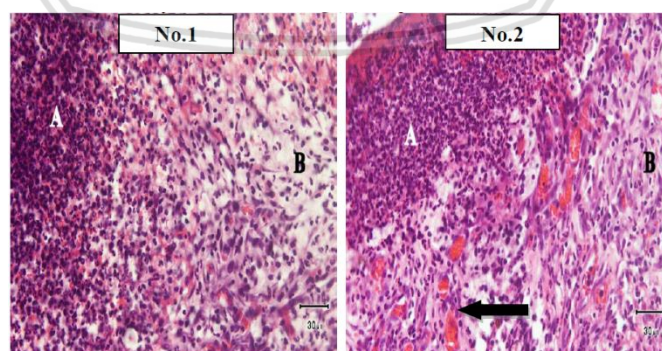
2.6.1 Histopatologi Luka Infeksi

Efek umum dengan munculnya bakteri *Staphylococcus aureus* adalah penurunan kemotaksis dan deplesi platelet, fungsi leukosit akan terganggu, peningkatan metabolit vasokonstriksi dapat menyebabkan keadaan hipoksia

sehingga dapat terjadi kerusakan jaringan. Pada pengamatan gambaran histopatologi luka dilakukan dengan melihat kualitas luka menggunakan preparat yang diwarnai dengan pewarnaan *Hematoxylin-Eosin*. Kualitas luka dilihat dengan mengamati lesio-lesio yang terjadi pada daerah luka yaitu adanya sel radang, pembentukan epitelisasi, neovaskularisasi, adanya fibroblas dan kontraksi pada luka, dan pembentukan folikel rambut serta kelenjar sebacea (Febram; dkk, 2010 dan Sastrawan, 2016). Secara histopatologi infeksi *Staphylococcus aureus* pada kulit ditandai dengan adanya abses dan infiltrasi neutrofil (Kobayashi.,*et al*, 2015).



Gambar 2.4 Gambaran Histopatologi kulit kelinci yang terinfeksi bakteri *S. aureus* pada kelinci (Kobayashi.,*et al*, 2015).



Gambar 2.5 Gambaran histopatologi kulit tikus penyembuhan luka infeksi bakteri terlihat adanya infiltrasi sel radang (A), proliferasi fibroblast (B) dan vaskularisasi baru (tanda panah) (HE, 400x) (Sastrawan,2016).

2.6.2 Kolagen

Kolagen memiliki peran utama penyembuhan luka. Kolagen memiliki kemampuan seperti hemostasis, interaksi dengan trombosit, interaksi dengan fibronectin, meningkatkan eksudasi cairan, meningkatkan komponen seluler, meningkatkan faktor pertumbuhan dan memacu proses fibroplasia dan proliferasi epidermis. Kolagen merupakan protein utama yang menyusun komponen matrik ekstraseluler dan merupakan protein terbanyak yang ditemukan dalam tubuh manusia. Kolagen tersusun atas triple helix dari tiga rantai α Polipeptida (Novriansyah, 2008). Kolagen dapat dilihat melalui pewarnaan HE sebagai zona rangkaian serat berwarna merah muda cerah (King, 2010). Pada penyembuhan luka, jaringan kolagen menyebar dengan kepadatan ringan dan terjadi pembentukan pembuluh darah baru (Lostapa, 2016).

2.6.3 Pembentukan fibroblast

Pada pemeriksaan histopatologi dengan pewarnaan *Hematoxylin-eosin*, fibroblast akan terlihat berkelompok membentuk suatu garis sejajar dengan sitoplasma berwarna kemerahan dan kepadatannya diukur dengan mikrometer *graticule* pada pembesaran 400x (Kiernan, 2008). Sel fibroblast dapat termati dengan gambaran sel besar, gepeng, bercabang, dan terlihat berbentuk gelendong dari samping atau fusiform, Cabang-cabangnya berbentuk langsing. Fibroblast memiliki inti yang tampak pucat. Fibroblast terlihat mengkerut dan berwarna gelap dengan pewarnaan basa.

2.7 VCO (*Virgin Coconut Oil*)

Minyak kelapa merupakan minyak nabati yang dihasilkan dari daging buah kelapa. *Virgin coconut oil* (VCO) merupakan minyak kelapa murni yang

terbuat dari daging kelapa segar yang diolah tanpa pemanasan, sehingga kandungan yang penting dalam minyak tetap dapat dipertahankan. Hasil dari pengolahan kelapa menjadi VCO berupa minyak kelapa murni yang berbau khas kelapa, tidak berwarna atau jernih (Susilowati, 2009). VCO mengandung berbagai macam asam lemak baik asam lemak jenuh maupun tak jenuh yang dapat dilihat pada tabel 2.1.

Tabel 2.1 Komposisi asam lemak minyak kelapa menurut Susilowati (2009)

No	Asam lemak	Rumus kimia	Jumlah kandungan (%)
A.	Asam lemak jenuh:		
1.	Asam kaproat	$C_5H_{11}COOH$	0,0 – 0,8
2.	Asam kaprilat	$C_7H_{17}COOH$	5,5 – 9,5
3.	Asam kaprat	$C_9H_{19}COOH$	4,5 – 9,5
4.	Asam laurat	$C_{11}H_{23}COOH$	44,0 – 52,0
5.	Asam miristat	$C_{13}H_{27}COOH$	13,0 – 19,0
6.	Asam palmitat	$C_{15}H_{31}COOH$	7,5 – 10,5
7.	Asam stearate	$C_{17}H_{35}COOH$	1,0 – 3,0
8.	Asam arachidat	$C_{19}H_{39}COOH$	0,0 – 0,4
B.	Asam lemak tidak jenuh:		
1.	Asam palmitoleat	$C_{15}H_{29}COOH$	0,0 – 1,3
2.	Asam oleat	$C_{17}H_{33}COOH$	5,0 – 8,0
3.	Asam linoleat	$C_{17}H_{31}COOH$	1,5 – 2,5

Komponen asam lemak dalam VCO dengan kandungan tertinggi asam laurat bermanfaat bagi kesehatan. Asam laurat merupakan jenis asam lemak jenuh dengan rantai karbon C yang dalam tubuh manusia diubah menjadi suatu bentuk

senyawa monogliserida yaitu monolaurin. Monolaurin merupakan senyawa yang bersifat antivirus dan antijamur. Monolaurin efektif dalam mematikan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Helicobacter pylori* (Pulung.,dkk, 2016). Monolaurin, selain sebagai antivirus, antibakteri, dapat bersifat antiprotozoa dan antioksidan.

Menurut Dewandono (2014) VCO (*Virgin Coconut Oil*) kandungan asam lemaknya mudah diserap ke dalam sel kemudian ke dalam mitokondria, sehingga metabolisme meningkat. Adanya peningkatan metabolisme maka sel-sel bekerja lebih efisien membentuk sel-sel baru serta mengganti sel-sel yang rusak lebih cepat. Minyak kelapa murni juga dapat digunakan sebagai pelembab kulit alami karena mampu mencegah kerusakan jaringan dan memberikan perlindungan terhadap kulit tersebut.

2. 7. 1 VCO Hasil Pengasaman Jeruk Nipis

Pembuatan minyak kelapa dapat dilakukan dengan menggunakan dua cara yaitu cara kering dan cara basah. Ekstraksi minyak secara kering dilakukan dengan cara pengepresan kemudian dilakukan pemurnian pada minyak yang dihasilkan. Sedangkan pembuatan minyak secara basah dapat dilakukan dengan proses pemanasan, fermentasi, pengasaman dan penambahan enzim (Arsa dkk., 2004).

Kelapa mengandung banyak protein dan lemak. Pembuatan minyak kelapa dengan pengasaman dilakukan dengan perusakan emulsi. Emulsi adalah cairan yang terbentuk dari campuran dua zat atau lebih yang sama, di mana zat yang satu terdapat dalam keadaan terpisah secara halus atau merata di dalam zat yang lain. Sementara yang dimaksud dengan emulgator adalah zat yang berfungsi untuk mempererat emulsi tersebut. Dari ikatan tersebut protein akan mengikat butir butir minyak kelapa dengan suatu lapisan tipis sehingga butir butir minyak tidak akan

bisa bergabung, demikian juga dengan air. Emulsi tersebut tidak akan pernah pecah karena masih ada tegangan muka protein air yang lebih kecil dari protein minyak. Minyak kelapa (VCO) dapat dikeluarkan jika ikatan emulsi tersebut dirusak. Pengasaman adalah salah satu cara pembuatan VCO dengan membuat suasana emulsi (santan) dalam keadaan asam. Asam memiliki kemampuan untuk memutus ikatan lemak protein dengan cara mengikat senyawa yang berikatan dengan lemak. Namun asam yang dicampurkan kedalam santan hanya bisa bekerja dengan maksimal bila kondisi pH (derajat keasamannya) sesuai. Pada proses pembuatan VCO, pH yang paling optimal yaitu 4,3 (Widiandani, 2010). Pembuatan VCO dengan pengasaman memiliki kelebihan yaitu:

- a. Warna lebih bening dibandingkan dengan VCO yang dibuat secara tradisional.
- b. Kandungan asam lemak dan antioksidannya tidak banyak berubah karena proses hanya memutuskan ikatan protein lemak saja.
- c. Pembuatan relatif mudah

Kandungan minyak pada daging buah kelapa tua diperkirakan mencapai 30%-35%. Pembuatan minyak kelapa dengan cara pengasaman lebih cepat menghasilkan minyak, karena kondisi asam dapat menyebabkan protein kehilangan sifatnya sebagai emulsifier sehingga terjadi pemisahan minyak dengan airnya. Senyawa asam yang terdapat pada buah jeruk nipis dapat menurunkan pH krim santan, Jeruk nipis mengandung asam sitrat ($C_6H_8O_7$) 7-7,6% dalam 100 gram. Asam sitrat dapat membantu pada proses pembuatan minyak kelapa, karena ketika air jeruk nipis bereaksi dengan krim santan maka akan lebih mempercepat proses pemisahan antara fase minyak dan airnya (Salsabila, 2016).

2.8 Mencit

Klasifikasi mencit menurut Akbar (2010) adalah sebagai berikut :

Kingdom : Animalia

Filum : Chordata

Klas : Mamalia

Ordo : Rodentia

Famili : Muridae

Genus : Mus

Spesies : *Mus musculus*

Mencit (*Mus musculus*) merupakan hewan yang sering digunakan dalam penelitian. Mencit yang digunakan di laboratorium merupakan turunan dari mencit liar yang sudah dilakukan pembiakan secara selektif. Hewan coba mencit (*Mus musculus*) secara biologis memiliki karakteristik berupa rambut berwarna putih atau keabu-abuan dan warna bagian perut sedikit lebih pucat (**Gambar 2.4**). Mencit adalah hewan nokturnal yang kerap melakukan aktivitas pada malam hari. Sifat alamiah mencit dipengaruhi oleh faktor internal maupun eksternal. Faktor internal meliputi seks, perbedaan umur, hormon, kehamilan, dan penyakit. Faktor eksternal yang dapat mempengaruhi yaitu makanan, minuman, dan kondisi lingkungan. Mencit memiliki berat badan saat lahir berkisar antara 2 sampai 4 gram, sedangkan berat badan mencit dewasa yaitu antara 20 hingga 40 gram untuk mencit jantan dan 25 hingga 40 gram untuk mencit betina dewasa. Diantara spesies-spesies hewan lainnya, mencit yang paling banyak digunakan untuk kepentingan penelitian dalam medis (60-80%) karena murah dan mudah berkembang biak (Kusumawati, 2004). Mencit sering digunakan sebagai penelitian dengan beberapa alasan yaitu

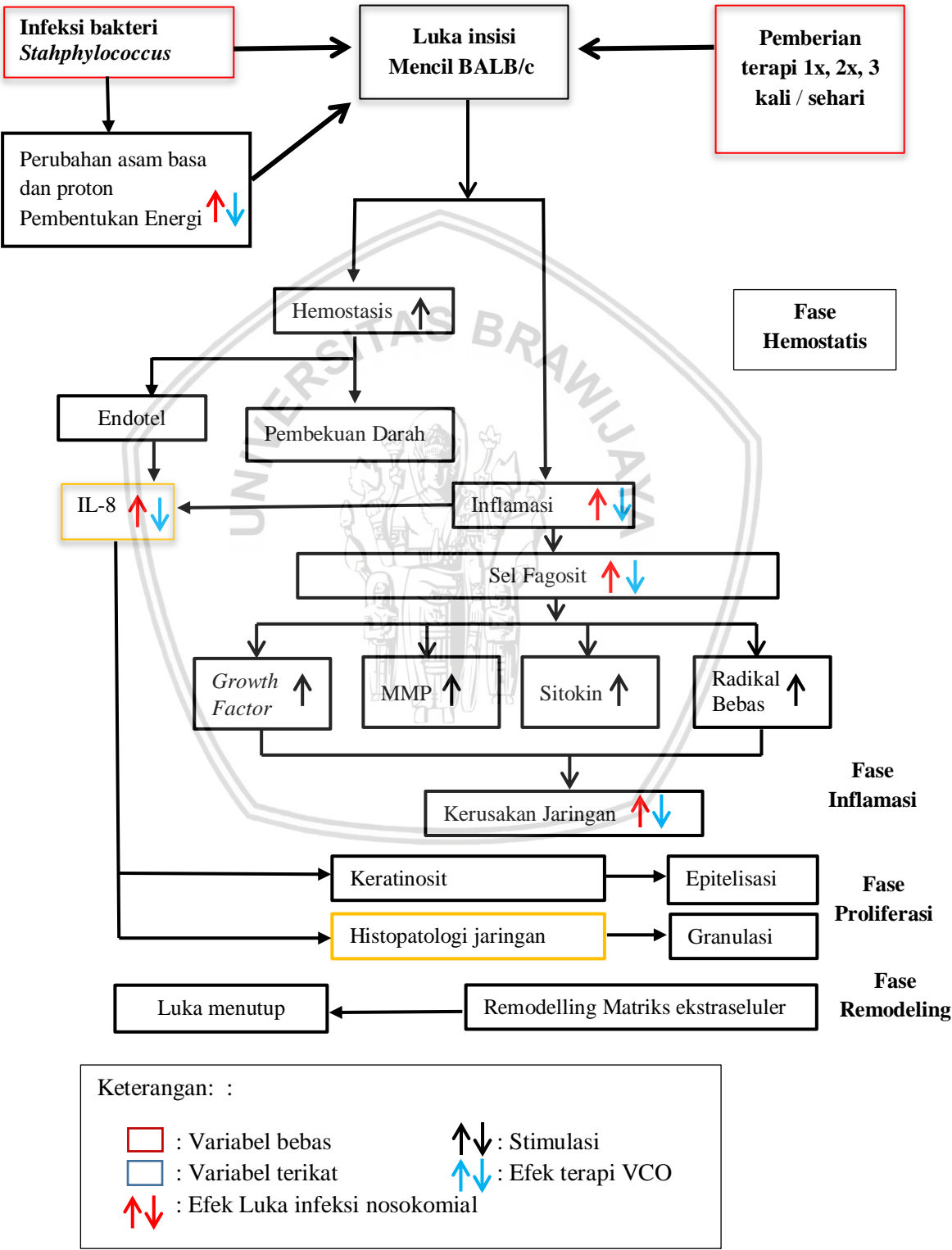
memiliki kesamaan fisiologis dengan manusia, siklus hidup yang relatif pendek, jumlah anak per kelahiran yang cukup banyak, variasi sifat-sifatnya tinggi, harga relatif murah dan mudah dalam penanganan. Menurut penelitian (Hasmila; dkk, 2015) hewan coba mencit dapat digunakan sebagai hewan model yang diinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus* untuk melihat proses penyembuhan luka dengan terapi ekstrak daun sirsak.



Gambar 2. 6 Morfologi mencit *Mus-musculus* (Henrich, 2004)

BAB III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual Terapi VCO



Infeksi nosokomial merupakan infeksi yang diperoleh selama perawatan di rumah sakit. Pada umumnya infeksi nosokomial didapatkan penderita setelah 48 jam masa perawatan di rumah sakit. Infeksi nosokomial dapat ditularkan oleh patogen rumah sakit dengan kontak langsung, peralatan, udara maupun vektor. Salah satu patogen yang menjadi penyebab tertinggi infeksi nosokomial adalah bakteri *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* akan menginfeksi kulit dan menyebabkan infeksi luka nosokomial pada jaringan kulit.

Bakteri merupakan antigen yang dapat terikat pada sel. Sel yang berikatan selanjutnya mempresentasikan pada sel Langerhans, makrofag dan dendrosit dermis. Sel tersebut akan memproses antigen dan mempresentasikan fragmen antigen kepada limfosit.

Pada saat memasuki fase hemostasis yang bertujuan untuk penghentian perdarahan. Saat fase hemostatis, trombosit akan keluar dari pembuluh darah dan saling berlekatan. Bersamaan dengan hal tersebut terjadi pembentukan benang fibrin untuk pertautan luka dan pembekuan darah yang keluar dari pembuluh darah. Trombosit yang keluar dari pembuluh darah berfungsi untuk membentuk bekuan darah serta menghasilkan *growth factor* berupa PDGF, IGF-1, EGF, FGF, dan TGF- β yang berperan dalam merangsang pertumbuhan dan proliferasi. Pada fase inflamasi ini, endotel dan jaringan yang telah rusak akan menghasilkan mediator pro-inflamasi seperti Interleukin-8 (IL-8). IL-8 yang mana disekresikan oleh makrofag yang teraktivasi dan terstimulasi luka. IL-8 pada proses inflamasi menyebabkan agregasi dan aktivasi dari neutrofil pada jaringan luka dan serta *chemoattractant* dan aktivator neutrofil yang kuat. Limfosit kemudian akan membentuk sel inflamasi. Bila ada antigen, limfosit akan mengaktivasi sel endotel

gepeng untuk mengumpulkan limfosit lain sebagai bagian dari reaksi inflamasi yang ditimbulkannya. Respons imun dapat pula ditimbulkan di epidermis. Sel T masuk ke dalam epidermis dari dermis. Agar hal ini dapat terjadi sel T harus melewati daerah membran basalis dan menembus keratinosit. Substansi mediator seperti IL-8 dianggap berperan terhadap penarikan limfosit ke dalam epidermis. Keratinosit memproduksi IL-8 terutama bila dirangsang oleh gamma-interferon. Bila telah terdapat dalam epidermis, limfosit dapat diaktivasi oleh sel Langerhans. Keadaan ini dapat memperkuat respons imun dan membantu eliminasi antigen atau menghancurkan sel yang terinfeksi. Sejumlah sel helper dan sel supresor pada infiltrat akan mengatur proses inflamasi yang terjadi. Setelah leukosit keluar dari dinding endotel, sel-sel tersebut bergerak menuju jaringan yang terluka mengikuti suatu kekuatan yang merangsang sel leukosit dan disebut sebagai kemotaksis. Kemotaksis adalah migrasi dari sel-sel menuju suatu senyawa penarik atau *attractant*. Pada saat memasuki fase inflamasi akut, jaringan yang rusak akan dieliminasi dan terjadi proses perlawanan infeksi dari bakteri patogen. Sel yang telah rusak berfungsi sebagai faktor kemotaktik dari sel radang sebagai respon inflamasi. Jaringan tersebut yang berperan sebagai faktor kemotaktik dapat mengeluarkan sitokin sehingga sel radang seperti leukosit, makrofag dan limfosit bergerak menuju luka. Sel radang tersebut akan menghasilkan *growth factor*, MMP, dan ROS. Jika proses inflamasi berlangsung lama maka dapat menimbulkan inflamasi kronis sehingga penyembuhan luka lebih lama.

Interleukin 8 dan sel radang selanjutnya mengalami penurunan sesudah fase inflamasi. Fibroblast meletakkan substansi dasar dan serabut kolagen untuk peningkatan renggangan luka. Selanjutnya, fase proliferasi terjadi dengan proses

angiogenesis dan pembuluh kapiler dibentuk oleh tunas endothelial. Jaringan yang telah dibentuk dari kapiler menghasilkan jaringan granulasi merah terang. Proses akhir pada fase pembentukan luka yaitu remodeling. Fase remodeling ini, fibroblast akan membentuk matriks ekstraseluler yang mengandung myofilamen yang akan bermigrasi ke area luka dan mengalami kontraksi untuk mengurangi ukuran luka sehingga daerah luka akan tertutup.

VCO berperan pada penyembuhan luka dengan kandungan zat aktif antimikrobal seperti asam lemak trigliserida yang berubah menjadi monogliserida dan asam lemak bebas pada saat berada dalam tubuh. Asam lemak dengan kandungan tertinggi dalam VCO serta berperan sebagai antibakteri adalah asam laurat dan asam kaprat dengan kandungan monogliserida berupa monolaurin dan monokaprin. Asam laurat tersebut melawan infeksi bakteri dengan cara mengganggu keseimbangan asam-basa, proton dan produksi energi di dalam sel bakteri sehingga bakteri menjadi mati serta mampu menstimulasi respon imun dengan meningkatkan sel T khususnya sel Th-CD4 sehingga mempercepat produksi antibodi oleh sel B dan juga menghasilkan zat-zat yang mengaktifkan sel T sitotoksik.

Ekspresi IL-8 dapat menurun dengan memperpendek tahap inflamasi. Proses VCO dalam memperpendek inflamasi yaitu dengan cara menghambat sintesis mediator inflamasi seperti *histamine*, serotonin dan prostaglandin. Dengan peran *histamine* yang dihambat, permeabilitas vaskuler dapat diturunkan. Terhambatnya kinin juga memberikan pengaruh dalam menurunkan permeabilitas vaskuler, vasokonstriksi, dan penurunan rasa nyeri. Selanjutnya ketika prostaglandin dihambat, terjadi vasokonstriksi vaskuler sehingga akan sulit dilalui

oleh larutan protein yang berupa koloid. Penurunan permeabilitas tersebut menyebabkan penurunan jumlah cairan yang keluar dari pembuluh darah kapiler, dan edema tidak terbentuk.

Asam laurat berperan dalam memodulasi proliferasi sel, *cell signaling*, dan aktivitas *growth factor*. *Growth factor* ini memiliki peran untuk merangsang pertumbuhan dan proliferasi dari sel luka seperti keratinosit dan fibroblast untuk bermigrasi ke dalam bagian ruang luka. Selanjutnya luka akan mengalami proses proliferasi. Pada fase ini, VCO juga mampu mempercepat proliferasi dan jumlah fibroblast yang terbentuk juga akan meningkat.

3.2 Hipotesis Penelitian

1. Terapi *Virgin Coconut Oil* (VCO) hasil pengasaman jeruk nipis dapat digunakan sebagai terapi luka insisi hewan model nosokomial oleh *Staphylococcus aureus* dengan menurunkan ekspresi IL-8.
2. Terapi *Virgin Coconut Oil* (VCO) hasil pengasaman jeruk nipis dapat digunakan sebagai terapi luka insisi hewan model nosokomial oleh *Staphylococcus aureus* dengan perbaikan jaringan luka secara histopatologi.

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret dengan beberapa laboratorium yaitu:

1. Pemeliharaan hewan coba dan pemberian perlakuan percobaan dilakukan di Laboratorium Fisiologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* 10^5 CFU/ ml di Laboratorium Mikrobiologi FK UB dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
3. Pembuatan serta pembacaan preparat histopatologi dilakukan di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
4. Pembuatan *Virgin Coconut Oil* (VCO) hasil pengasaman jeruk nipis dilakukan di Laboratorium Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
5. Uji *Flowcytometri* untuk pengamatan kadar relatif IL-8 dilakukan di Laboratorium Biomolekuler Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya.

4.2 Alat dan Bahan

Alat yang dipergunakan dalam penelitian ini yaitu disceting set, perkandangan mencit, tempat pakan dan minum mencit, blender, *beaker glass*, mikroskop, *gloove*, pipet, spuit, botol penampung VCO, bunsen, autoklaf, cawan

petri, tabung reaksi, ose, benang silk 4/0, jarum GT, spektrofotometri, *object glass*, *cover glass*, Alat uji *Flowcytomertri* yakni *yellow tip*, *blue tip*, mortir, *sentrifuge*, *T flowcytometer*, dan *software BD Cell Quest ProTM*.

Bahan yang dipergunakan pada penelitian ini yaitu hewan coba Mencit (*Mus musculus*) BALB / c jenis kelamin jantan, berat $24,2 \pm 30,0$ gram dengan umur 8 minggu, aquades, akuades *pro inject*, kelapa, jeruk nipis, alkohol 70 %, ketamin HCL, Xylazin, biakan bakteri *Staphylococcus aureus*, antibodi IL-8, pewarna *Hematocysten- Eosin*, NaCl fisiologis, serta Xylol.

4.3 Tahapan Penelitian

Pada penelitian ini, tahapan yang dilakukan meliputi:

1. Perancangan penelitian dan persiapan hewan coba yang digunakan
2. Pembuatan *Virgin Coconut Oil* (VCO) dengan perasan jeruk nipis
3. Pemberian perlakuan berupa insisi dan penjahitan hewan coba mencit dengan benang terkontaminasi bakteri MRSA
4. Terapi hewan coba dengan *Virgin Coconut Oil* (VCO)
5. Pengambilan sampel jaringan dan pembuatan preparat histopatologi kulit
6. Pengamatan kadar relatif IL-8 dengan metode *flowcytometri*
7. Pengamatan histopatologi dengan metode pewarnaan Hematoksilen- Eosin
8. Analisa data

4. 3. 1 Rancangan Penelitian

Pada penelitian ini digunakan eksperimen laboratorik dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan *post control only*. Hewan coba mencit dibagi

menjadi beberapa kelompok penelitian dengan masing-masing perlakuan.

Kelompok perlakuan dalam penelitian ini antara lain :

1. Kelompok 1 merupakan mencit yang diinsisi dan dijahit dengan benang *silk* secara aseptis diberikan perlakuan standard sesuai prosedur operasi di klinik FKH UB sebagai kontrol negatif.
2. Kelompok 2 merupakan mencit yang telah dilakukan insisi dan dijahit dengan benang *silk* yang terinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus* 10^5 CFU/ml tanpa pemberian *Virgin Coconut Oil* (VCO) dengan pengasaman perasan jeruk nipis sebagai kontrol positif.
3. Kelompok 3 merupakan mencit yang telah dilakukan insisi dan dijahit dengan benang terkontaminasi bakteri *Staphylococcus aureus* 10^5 CFU/ml serta dilakukan terapi *Virgin Coconut Oil* (VCO) dengan pengasaman perasan jeruk nipis frekuensi pemberian 1 kali.
4. Kelompok 4 merupakan mencit yang telah dilakukan insisi dan dijahit dengan benang terkontaminasi bakteri *Staphylococcus aureus* 10^5 CFU/ml serta dilakukan terapi *Virgin Coconut Oil* (VCO) dengan pengasaman perasan jeruk nipis frekuensi pemberian 2 kali.
5. Kelompok 5 merupakan mencit yang telah dilakukan insisi dan dijahit dengan benang terkontaminasi bakteri *Staphylococcus aureus* 10^5 CFU/ml serta dilakukan terapi *Virgin Coconut Oil* (VCO) dengan pengasaman perasan jeruk nipis frekuensi pemberian 3 kali.

4. 3.2 Penetapan Sampel Penelitian

Hewan model yang digunakan pada penelitian ini yaitu mencit (*Mus musculus*) BALB/c jantan dengan berat $24,2 \pm 30,0$ gram dan berumur 8 minggu.

Pada penelitian ini dilakukan dengan 5 kelompok perlakuan. Menurut (Montgomery and Kowalsky, 2011) penentuan banyaknya perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$t(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$4n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

t = kelompok perlakuan

n = jumlah sampel perkelompok perlakuan

Dari perhitungan diatas, maka dari 5 kelompok perlakuan dibutuhkan jumlah sampel ulangan 4 kali, sehingga dibutuhkan 20 ekor mencit.

4.3.3 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini yaitu :

- Variabel bebas : Frekuensi terapi pemberian *Virgin Coconut Oil* (VCO) dan bakteri *Staphylococcus aureus* 10^5 CFU/ml.
- Variabel terikat : Kadar relatif IL-8 dan perubahan Histopatologi jaringan
- Variabel kontrol : Homogenitas mencit yang terdiri dari jenis kelamin, berat badan, umur, pakan, kandang dan perlakuan hewan model luka nosokomial.

4.4 Prosedur Kerja

4.4.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan sebagai sampel penelitian adalah mencit. Mencit yang digunakan berasal dari spesies *Mus musculus* galur BALB/c jantan dengan berat $24,2 \pm 30,0$ gram dengan umur 8 minggu.

Mencit dipilih karena memiliki morbiditas yang rendah dan penyembuhan luka kulit yang lebih cepat (Abdullah., dkk, 2014). Mencit dilakukan aklimatisasi atau adaptasi selama 7 hari sebelum perlakuan. Mencit yang terbagi atas 5 kelompok perlakuan dengan masing- masing kandang terdiri dari 5 mencit. Kandang mencit terbuat dari bahan plastik dengan tutup berbahan kawat serta dilakukan pemberian alas berupa sekam kayu sehingga kandang menjadi tidak lembab. Penggunaan sekam sebagai alas kandang efektif dalam penyerapan urin dan amoniak sehingga performa mencit lebih baik (Rakhmadi.,dkk, 2009). Pemberian pakan pada mencit ± 20 gram pakan serta pemberian air minum yang *ad libitum* (Gani, dkk, 2013). Mencit selanjutnya dilakukan pemeliharaan dan perlakuan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang.

4.4.2 Pembuatan *Virgin Coconut Oil* (VCO) Hasil Pengasaman Jeruk Nipis

Proses pembuatan *Virgin Coconut Oil* (VCO) dapat diawali dengan pemilihan kelapa. Kelapa yang digunakan adalah kelapa tua berumur 10- 11 bulan. Indikator kematangan kelapa yaitu kulit yang berwarna kuning hingga kecoklatan serta timbulnya suara cairan saat dikocok (Srivastava.,dkk, 2013). Kelapa kemudian dikupas dan diambil buahnya dari tempurung. Buah kelapa selanjutnya dibersihkan, dihaluskan, ditambah air dan diambil santannya. Santan yang dihasilkan kemudian didiamkan untuk memisahkan antara krim dan skim. Krim merupakan bagian atas lapisan santan yang mengandung banyak minyak, sedangkan skim

merupakan bagian bawah santan yang umumnya terdiri dari air dan sedikit protein. Santan didiamkan selama 2 jam hingga terbentuk lapisan antara skim dan krim. Krim yang dihasilkan kemudian diambil untuk pembuatan VCO dengan pengasaman menggunakan jeruk nipis. Metode pengasaman adalah terjadinya denaturasi protein dikarenakan terbentuknya ion zwitter pada kondisi iso elektronik. Muatan yang berlawanan dimasing-masing ujung molekul akan membentuk zwitter ion. Protein pada santan mengandung gugus NH_2 yang memiliki muatan positif dan gugus karboksilat yang memiliki kandungan negatif. Kondisi iso elektris dapat dicapai dengan membuat santan pada kondisi asam (Salsabila, 2016). Pembuatan VCO dilakukan dengan pengambilan bagian krim. Pembuatan VCO metode pengasaman dapat digunakan jeruk nipis konsentrasi 1% (Qosimah, 2017). Krim yang ditambahkan jeruk nipis selanjutnya didiamkan 10-24 jam hingga terbentuk lapisan minyak, blondo dan air. Minyak yang dihasilkan selanjutnya disaring dan ditampung.

4.4.3 Pembuatan Suspensi Bakteri

Pembuatan suspensi bakteri diawali dengan peremajaan bakteri *Staphylococcus aureus* kultur murni pada *Nutrient Agar* (NA) *Slant* steril. Bakteri *Staphylococcus aureus* selanjutnya diinokulasikan 1 ose pada 2 ml NB kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C . Bakteri *S. aureus* merupakan bakteri gram positif yang dapat ditanam dengan ose steril, media dan koloni distandarkan menggunakan standar *Mc. Farland* (Warbung.,dkk, 2013). *S. aureus* selanjutnya dibuat kultur cair menggunakan NB dengan larutan standar 1 *Mc.Farland* I (populasi $\pm 3 \times 10^8$

CFU/ml). Berikutnya bakteri dilakukan pengenceran dengan NB steril sehingga konsentrasinya mencapai 10^5 CFU/ml (**Lampiran 5**). Bakteri *S. aureus* pada penelitian ini diuji sensitivitas terhadap antibiotik menggunakan metode difusi cakram kertas dengan cara meletakkan pada permukaan medium *Mueller-Hinton* agar yang telah diinokulasikan bakteri tersebut. Selanjutnya dilakukan inkubasi 24 jam serta diamati zona hambat yang terbentuk dengan penggaris atau jangka sorong (Rahmaniar, 2017).

4.4.4 Pembuatan Benang yang Terkontaminasi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Pembuatan benang yang terkontaminasi pada penelitian ini digunakan bakteri *Staphylococcus aureus* 10^5 CFU/ml dan benang silk. *S. aureus* 10^5 yang telah dilakukan pengenceran selanjutnya dimasukan pada tabung reaksi sebanyak 10 ml, kemudian dimasukan benang *silk* steril dan divortex selama 10 detik. Tahap ini sebanyak 10^5 dapat terabsorbsi pada setiap segmen benang yang digunakan. Proses berikutnya segmen dikeluarkan dari tabung kemudian dikeringkan dalam cawan petri lain yang steril sehingga benang tidak terkontaminasi oleh bakteri lainnya. Benang jahit merupakan peralatan bedah yang mudah terkontaminasi dan menimbulkan luka nosokomial (Ferryansah., dkk, 2009)

4.4.5 Pembuatan Luka Infeksi Nosokomial pada Hewan Coba

Pembuatan Luka Infeksi Nosokomial dilakukan pada hewan coba berupa mencit. Mencit diberikan beberapa perlakuan. Hewan coba dan penelitian yang dilakukan sebelumnya telah didaftarkan Laik etik di Komisi Etik Penelitian UB. Mencit diberikan penanda menggunakan spidol pada

bagian ekor sesuai dengan kelompok perlakuan. Selanjutnya, mencit dilakukan anasthesi menggunakan anastesi umum berupa kombinasi *ketamine* HCl (dosis 100 mg/kgBB) dan *Xylazine* (dosis 5 mg/kgBB) (Bramson dan Robert, 1999) yang diberikan secara Intraperitoneal. Cairan *xylazine* 20 mg/ml sebanyak 0,5 ml diencerkan dengan cara dicampur dengan 19,5 ml aqua pro injeksi di dalam vial steril. Tujuan dari tahap ini yaitu untuk memudahkan injeksi pada mencit. Berikutnya, *Ketamine* HCl 100 mg/ml sebanyak 2 ml dicampur dengan 18 ml aqua pro injeksi. Anestesi menggunakan *Ketamine* HCl – *Xylazine* disuntikkan dengan dosis 0.1 ml/10 gBB pada bagian abdomen mencit (Plumb, 2008). Langkah berikutnya dilakukan pencukuran pada daerah punggung, dibasahi dengan larutan sabun dan dibersihkan dengan alkohol 70 %. Setelah kondisi bersih, punggung mencit diinsisi *longitudinal midline* dengan panjang 2.5 cm hingga *panniculus carnosus*. Luka yang ada kemudian dilakukan penjahitan dengan benang silk 4/0 yang telah terkontaminasi bakteri *S. aureus* (10^5 CFU/ml). Penjahitan dilakukan menggunakan jarum *tapper* 1/2 GT 35 mm pola *simple continuous suture* dengan panjang benang 5 cm secara diagonal pada *panniculus carnosus*.

4.5 Terapi *Virgin Coconut Oil* (VCO)

Terapi *Virgin Coconut Oil* (VCO) pada mencit dilakukan dengan pengolesan pada luka insisi dan bekas jahitan. Terapi dilakukan sesuai kelompok perlakuan, yaitu 1 kali pada pagi hari, 2 kali pada pagi dan siang hari, dan 3 kali pada pagi, siang dan sore hari dengan volume pemberian 1

tetes. Pemberian terapi dilakukan selama 7 hari. Pengamatan terhadap penyembuhan luka mencit dilakukan secara makroskopis setiap hari.

4.4.7 Pengambilan Jaringan Kulit

Pada penelitian ini, hewan coba yang telah diberikan perlakuan dan terapi, pada hari ke-15 dilakukan eutanasi dengan dislokasi *os occipital*, preparasi dan pengambilan sampel jaringan kulit. Pada bagian kulit punggung yang akan diambil jaringan kulitnya, terlebih dahulu dibersihkan dari bulu dengan cara pencukuran dan penyemprotan cairan sabun. Kulit mencit diambil pada ketebalan ± 3 mm sampai dengan subkutan dan luas 2×2 cm² dengan 1×1 cm² untuk masing-masing pengujian histopatologi dan *flowcytometri*. Kulit yang diperoleh tersebut, selanjutnya dibersihkan dengan larutan fisiologis dan benang dilepas. Kulit yang diperoleh difiksasi menggunakan larutan *Buffer Neutral Formalin* atau BNF 10% (Murti., dkk, 2017).

4.4.8 Pembuatan Preparat Histopatologi Kulit

Sampel kulit yang telah dieksisi kemudian dimasukkan larutan Formalin konsentrasi 10%, dan dilakukan *trimming* organ lalu dimasukan *tissue casset*. *Trimming* organ bertujuan untuk memilih sampel yang akan dibuat preparat (Pratiwi, 2015). Proses berikutnya jaringan dilakukan dehidrasi dengan larutan aseton sebanyak 2x masing-masing selama 1 jam. Proses selanjutnya yaitu *clearing* dalam larutan xylol sebanyak 2x masing-masing selama 1 jam. Setelah itu, jaringan dilakukan parafinisasi atau percetakan dalam larutan xylol selama 1,5 jam dan parafin infiltrasi selama 1,5 jam. Selanjutnya, jaringan ditanam pada *paraffin block* (**Lampiran 2**).

Bagian yang sudah padat dipotong setebal 4 – 5 μ menggunakan mikrotom (Suwiti, 2010). Jaringan yang telah terpotong ditempelkan pada kaca objek yang terlebih dahulu diolesi albumin-gliserin sebagai perekat. Jaringan pada kaca obyek ditunggu hingga kering. Selanjutnya pewarnaan *Hematoksilen-Eosin* (HE) digunakan untuk pengamatan gambaran histopatologi kulit (**Lampiran 3**).

4.4.9 Pengukuran Kadar relatif IL-8 dengan Flowcytometry

Pengukuran Kadar relatif Interleukin-8 diawali pengambilan sampel kulit dengan margin 1 cm dari tepi atas, bawah, kiri, dan kanan dari garis insisi. Sampel disimpan pada *mikrotube* yang berisi *Phospat Buffer Saline* (PBS) dan dimasukkan pada ice box. Sampel selanjutnya dibersihkan menggunakan PBS sebanyak dua kali, setelah itu diletakan pada cawan petri yang berisi 5 ml PBS, digerus dengan bagian pangkal spuit kemudian dilakukan homogenisasi dan dilakukan suspensi menggunakan PBS kembali. Beberapa sel yang diperoleh dari hasil isolasi difilter menggunakan *wire* (**Lampiran 4**). Berikutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm, pada suhu 20°C selama 5 menit. Hasil supernatan dibuang dan pelletnya di fiksasi dengan 100 μ L *cytofix/cytoform* 10x dan diinkubasi kembali selama 20 menit. Larutan *cytofix/cytoform* memiliki fungsi memfiksasi dan menciptakan permeabilitas sel yang diperlukan untuk pewarnaan sitokin intraselular menggunakan antibodi anti-sitokin yang sudah terkonjugasi. Kemudian sampel dicuci dengan 1 ml *wash buffer* 10x. Supernatan yang terbentuk selanjutnya dibuang dan ditambahkan 50-100 μ L kemudian ditambahkan *antibodi intrascellular*

staining (anti IL-8) yang dikonjugasikan menggunakan label PE. Selanjutnya data dari *flowcytometry* dilakukan analisis menggunakan *software BD cellquest ProTM*. Selanjutnya dilakukan koneksi dengan komputer dan flowcytometer disetting dengan keadaan acquiring serta dilakukan setting sesuai parameter yang akan dianalisis. Selanjutnya dipilih acquire dan flowcytometer akan menghitung jumlah sel total serta jumlah sel yang terdeteksi oleh label antibodi. Hasil yang diperoleh selanjutnya diolah dengan *BD cellquest ProTM* (Mufidah, 2013).

4.5 Analisa Data

Analisa hasil dari histopatologi dilakukan dengan pengamatan mikroskopis sampel. Pengamatan kondisi histopatologi dilakukan dengan analisa deskriptif melalui pewarnaan *Hematoksilen-Eosin*. Selanjutnya kadar relatif interleukin-8 (IL-8) diamati secara kuantitatif menggunakan *flowcytometer* yang dianalisa dengan *software BD cellquest ProTM*. Hasil yang diperoleh selanjutnya dianalisis secara statistik menggunakan *software IBM SPSS Statistics 19®*. Pada penelitian ini analisa data yang diamati yaitu hasil kadar relatif Interleukin 8 dan gambaran histopatologi jaringan luka dengan uji *one way ANOVA* dan uji lanjutan BNJ (Beda Nyata Jujur) dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). *One way ANOVA* digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan tiap kelompok, dan dilanjutkan dengan BNJ untuk mengetahui hasil perbedaan notasi yang signifikan.

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

Luka merupakan rusaknya struktur fisik yang dapat diakibatkan oleh mikroba, trauma mekanik, kimia atau suhu yang mengenai jaringan yang menyebabkan terbuka atau hancurnya kulit dan ketidakseimbangan fungsi serta anatomi kulit (Rupina, 2016). Luka Insisi setelah operasi yang tidak mengalami perawatan dengan baik dapat menimbulkan infeksi nosokomial. Infeksi nosokomial (*Hospital Acquired Infection/Nosocomial Infection*) adalah infeksi yang didapat dari rumah sakit atau ketika penderita itu dirawat di rumah sakit (Nugraheni, 2012). Menurut Nasution (2012) mikroorganisme penyebab luka infeksi nosokomial dengan presentase kejadian paling tinggi yaitu bakteri *Staphylococcus aureus*.

Staphylococcus aureus dapat dilakukan identifikasi kemurnian dengan penanaman bakteri pada media *Mannitol Salt Agar* (MSA). Pada media MSA, *S. aureus* akan memfermentasi manitol dan berwarna kuning, (**Lampiran 6**). *Staphylococcus aureus* yang diperlukan pada penelitian ini merupakan bakteri *Multidrug resistant* (MDR), dimana pada uji antibiogram didapatkan hasil bakteri *S.aureus* resisten terhadap berbagai jenis antibiotik golongan penisilin, aminoglikosida, cephalosporin, tetracycline, dan quinolon (**Lampiran 7**). *Multidrug resistant* (MDR) adalah suatu keadaan dimana bakteri resisten terhadap tiga atau lebih golongan atau kelas antibiotik yang berbeda (D' agata, 2004 dalam Kurniawati *et al*, 2015). Resistensi terhadap antibiotik dapat mempersulit proses penyembuhan. Dengan adanya resistensi terhadap antibiotik maka diperlukan bahan alternatif yang bersifat alami salah satunya VCO.

Terapi VCO (*Virgin Coconut Oil*) pada penelitian ini diberikan secara langsung di luka jahitan selama tujuh hari pasca insisi. VCO memiliki kandungan asam lemak jenuh maupun tak jenuh. Asam laurat merupakan kandungan asam lemak tertinggi pada VCO. Di dalam tubuh asam laurat akan dirubah menjadi monolaurin, yang memiliki sifat antivirus, antibakteri dan antijamur (Pulung.,dkk,2016). VCO yang digunakan dalam penelitian ini telah dilakukan pengujian terhadap kadar pH dan kadar air (**Lampiran 9**).

Pada penelitian kali ini dilakukan dengan pembagian beberapa kelompok yaitu; 1) kontrol negatif dilakukan insisi dengan prosedur aseptis dan terapi antibiotik, 2) kelompok kontrol positif dilakukan insisi, benang dikontaminasi dengan *S. aureus* tanpa pemberian terapi, 3) kelompok terapi (K1, K2, K3) dilakukan insisi, benang dikontaminasi *S. aureus* dan diberikan terapi VCO dengan frekuensi 1x, 2x dan 3x sehari. Pada hewan coba penelitian ini, penyembuhan luka dapat diamati secara makroskopis secara langsung pada kulit insisi. Pada pengamatan hari ke-8 terdapat perbedaan antara kontrol negatif, positif, terapi 1x sehari, terapi 2x sehari dan terapi 3x sehari.

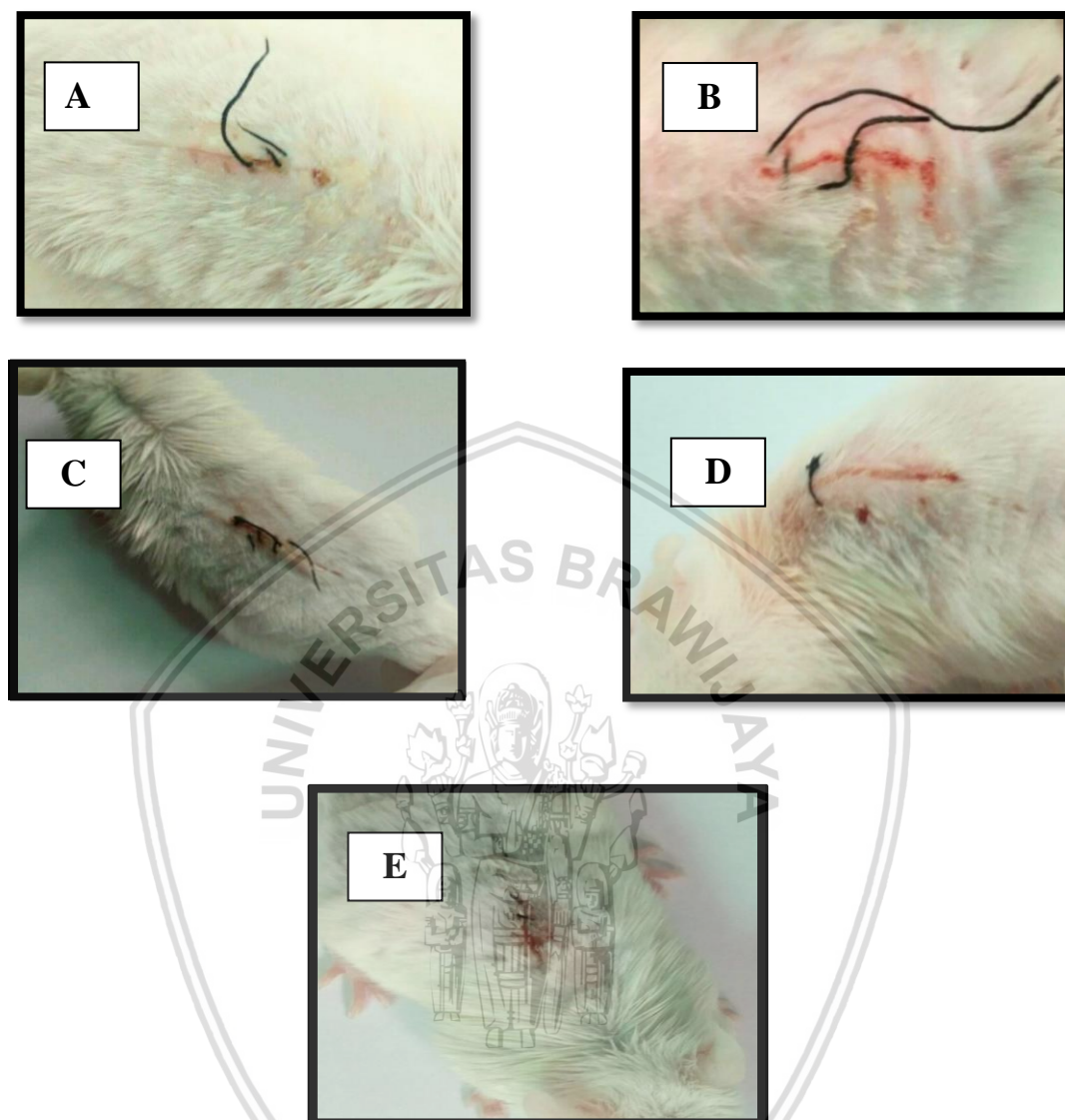
Pada kelompok negatif (**Gambar 5.1.A**), luka tidak dilakukan infeksi *S. aureus* serta di insisi secara steril dan pengobatan menggunakan antibiotik sehingga luka terlihat sebagai luka bersih (*clean wound*), menggambarkan hasil luka kering, insisi sudah menyatu, bekas insisi mulai menutup dan tidak mengalami inflamasi. Luka pada kelompok ini sudah memasuki pada fase proliferasi.

Pada kelompok positif (**Gambar 5.1.B**), kondisi luka infeksi nosokomial pada hewan coba mencit oleh bakteri *S. aureus* menunjukkan hasil luka insisi belum mengalami penyatuan, terlihat basah dan terjadi inflamasi.

Pada kelompok terapi 1x sehari (**Gambar 5.1.C**), luka infeksi nosokomial oleh *S. aureus* pada hewan mencit dan diberikan terapi menunjukkan hasil luka terlihat kering, insisi sudah menyatu, bekas insisi mulai tertutup dan pertumbuhan rambut. Luka kelompok ini merupakan luka yang mengalami penutupan terbaik diantara kelompok terapi lainnya. Kandungan asam laurat dan vitamin E pada VCO memiliki pengaruh baik pada penyembuhan luka. Asam laurat dapat bersifat antibakteri, antiinflamasi dan meningkatkan reepitelisasi. Vitamin E juga meningkatkan reepitelisasi dengan cara meningkatkan aliran darah menuju ke sel yang rusak sehingga mempercepat pemulihan sel epitel yang rusak (Widagdo, 2004).

Pada kelompok terapi 2x sehari (**Gambar 5.1.D**), luka infeksi nosokomial oleh bakteri *S. aureus* pada hewan mencit dan diberikan terapi menunjukkan hasil luka mulai mengering, insisi mulai menyatu akan tetapi bekas insisi masih terlihat serta inflammasi mulai berkurang. Pada kelompok terapi ini, penyembuhan luka mulai memasuki tahap proliferasi.

Pada kelompok terapi 3x sehari (**Gambar 5.1.E**), luka infeksi nosokomial oleh bakteri *S. aureus* pada hewan mencit dan diberikan terapi menunjukkan hasil luka mulai mengering, insisi mulai menyatu, dan inflammasi mulai berkurang. Pada kelompok terapi ini, penyembuhan luka mulai memasuki tahap proliferasi. Pada fase proliferasi, fibroblast bermigrasi menuju daerah luka dan merangsang sintesis kolagen. Keadaan ini diikuti oleh 3 proses yang berlangsung berurutan berupa epitelisasi, kontraksi luka dan pembentukan kolagen (Yunanda, 2016). Epitelisasi menutup permukaan luka dan kontraksi merapatkan jarak antara luka.

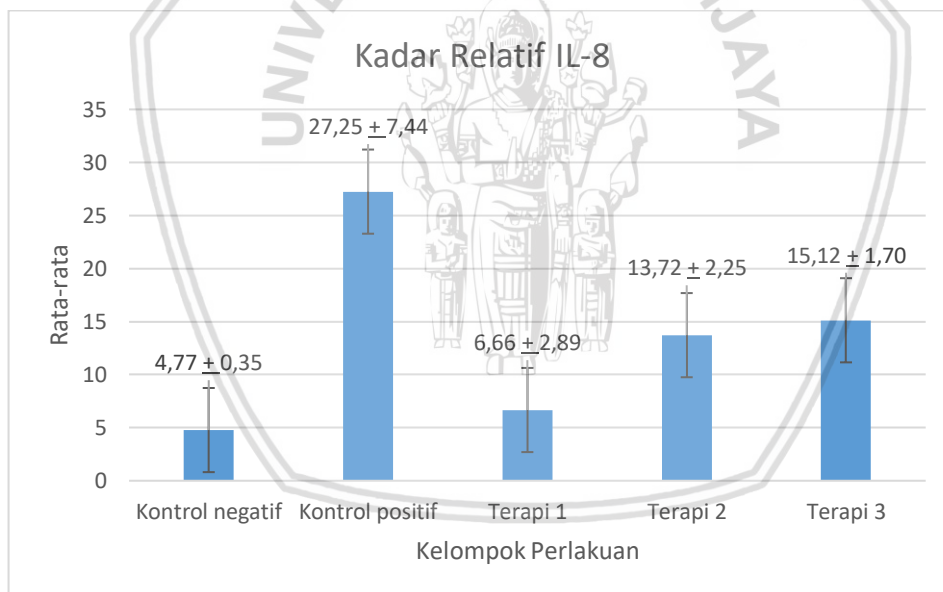


Gambar 5.1 Gambaran makroskopis jaringan kulit mencit pada hari ke delapan

- Keterangan :** (A) Kontrol Negatif : luka menutup, luka pada fase proliferasi
(B) Kontrol Positif : luka menutup tetapi renggang dan terdapat inflamasi
(C) Terapi VCO 1x sehari : luka menutup, luka pada fase Proliferasi
(D) Terapi VCO 2x sehari : luka menutup, luka pada fase Proliferasi
(E) Terapi VCO 3x sehari : luka menutup, luka pada fase Proliferasi

5.1 Pengaruh Pemberian VCO Hasil Pengasaman Jeruk Nipis Terhadap Ekspresi Interleukin-8 (IL-8) Sebagai Penyembuh Luka Insisi Pada Hewan Model Nosokomial oleh *Staphylococcus aureus*.

Hasil rata-rata ekspresi IL-8 pada jaringan kulit mencit (*Mus musculus*) model nosokomial pasca operasi yang diterapi VCO dan dianalisa menggunakan *flowcytometry*. Data yang didapatkan dilakukan analisis sehingga diperoleh bahwa rata-rata IL-8 tertinggi terdapat pada kontrol positif, terendah terdapat pada kontrol negatif, dan adanya penurunan pada setiap kelompok terapi jika dibandingkan dengan kontrol positif. Histogram hasil rata-rata kadar relatif ekspresi IL-8 berdasarkan *flowcytometry* ditunjukkan oleh **Gambar 5.2** berikut ini.



Gambar 5.2 Histogram rata-rata kadar relatif ekspresi IL-8 berdasarkan *flowcytometry* pada masing-masing kelompok perlakuan

Dari hasil perhitungan statistika dengan uji normalitas dan homogenitas (**Lampiran 10.1 dan 10.2**) data hasil pengukuran kadar relative ekspresi IL-8 dengan menggunakan metode *flowcytometri* menunjukkan bahwa data terdistribusi normal dan homogen, setelah itu dilanjutkan dengan uji *one way ANOVA*. Pada uji

one way ANOVA (**Lampiran 10.4**) diperoleh hasil nilai $p < 0,05$. Hasil tersebut menunjukkan adanya pengaruh terapi yang diberikan. Uji lanjutan yang dilakukan yaitu uji Beda Nyata Jujur (BNJ) atau Tukey dan didapatkan hasil bahwa antar kelompok memiliki perbedaan rata-rata yang signifikan. Hasil dari Uji BNJ (**Lampiran 10.5**) dapat dilihat dalam **Tabel 5.1** berikut ini.

Tabel 5.1 Rata-rata presentase kadar relatif IL-8

Kelompok	Rata-rata kadar IL-8 % \pm SD
Kontrol (-) luka + antibiotik	4,77 \pm 0,35 ^a
Kontrol positif (+)	27,25 \pm 7,44 ^d
Terapi 1 (1 x pemberian 50 μ l)	6,66 \pm 2,89 ^{ab}
Terapi 2 (2 x pemberian 100 μ l)	13,72 \pm 2,25 ^{bc}
Terapi 3 (3 x pemberian 150 μ l)	15,12 \pm 1,70 ^c

Keterangan : notasi a, b, c dan d menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$).

Berdasarkan data yang didapatkan, bisa diketahui terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) antara kelompok mencit kontrol positif K (+), kontrol negatif K (-) dan kelompok terapi 1 (1x pemberian VCO), terapi 2 (2x pemberian VCO) dan terapi 3 (3x pemberian VCO). Kontrol positif memiliki rata-rata yang paling tinggi yaitu 27,25, hal tersebut dikarenakan pada kontrol positif diberikan infeksi bakteri *S. aureus* tanpa pemberian terapi VCO. Infeksi *S. aureus* dapat merangsang respon imun tubuh. *S. aureus* akan masuk sebagai antigen sehingga tubuh akan berusaha mengeliminasi dengan makrofag serta neutrofil sebagai respon imun innate/nonspesifik.

Pada **Tabel 5.1**, dapat dilihat, terdapat perbedaan yang signifikan pada kelompok kontrol negatif K(-) dan kelompok Terapi 2 (2x pemberian) dan Terapi

3 (3x pemberian), sedangkan perbedaan yang signifikan juga terlihat pada kelompok Terapi 1(1x pemberian) dan kelompok Terapi 3 (3x pemberian). Sedangkan kelompok negatif (K-) tidak memiliki perbedaan signifikan terhadap kelompok terapi 1 (1x pemberian). Dari hasil tersebut dapat dilihat kelompok terapi 1 mengalami penurunan ekspresi IL-8 yang cukup tinggi dengan pemberian VCO hasil pengasaman jeruk nipis. Penurunan tersebut menunjukkan terapi VCO hasil pengasaman jeruk nipis dengan variasi pemberian yang sesuai dapat menurunkan ekspresi IL-8 pada hewan coba mencit model luka insisi nosokomial.

Pada penelitian ini, peningkatan ekspresi IL-8 terjadi pada kelompok kontrol positif, setelah munculnya respon imun *innate* tubuh yang teraktivasi ketika masuknya *S. aureus* melalui induksi superantigen (Pandaleke dan Pandaleke, 2014). Superantigen bakteri tersebut selanjutnya berinteraksi dengan sel dan menginduksi produksi sitokin serta kemokin. Sitokin yang berperan penting dalam proses inflamasi yaitu interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor (TNF), dan interleukin-8 (IL-8), sitokin tersebut dihasilkan oleh makrofag yang teraktivasi dan distimulasi oleh beberapa faktor, salah satunya adalah perlukaan fisik. Infeksi bakteri berupa antigen dapat menstimulasi produksi IL-8 sebagai respon pro inflamatorik (Suroto, 2001). Kadar Relatif IL-8 yang masih tinggi merepresentasikan bahwa luka masih berada pada tahap Inflamasi.

Interleukin-8 adalah salah satu sitokin pro inflamasi yang memiliki peran penting pada proses penyembuhan luka. IL-8 merupakan *chemoattractant* yang kuat dari neutrofil, basophil dan sel T. IL-8 juga memiliki efek inflamasi yang luas. IL-8 dapat menyebabkan kerusakan granula spesifik neutrofil dan memperkuat perlekatan neutrofil ke sel endothel dan matriks subendotel. IL-8 sebagai

chemoattractant dapat berperan menarik neutrofil ke jaringan yang rusak atau mengalami inflamasi sehingga dapat meningkatkan aktivitas fagositik. IL-8 dapat dihasilkan oleh fagosit mononuklear, epitel sel, endotel dan sel T yang diaktifkan antigen (Suroto, 2001). Ekspresi IL-8 dan beberapa sitokin yang semakin tinggi pada luka, menandakan bahwa luka memasuki fase inflamasi, sedangkan ekspresi IL-8 yang mengalami penurunan menandakan bahwa luka mulai memasuki tahapan selanjutnya (Prabakti, 2005).

Penurunan kadar relatif IL-8 pada penelitian ini didukung oleh kemampuan VCO sebagai antiinflamasi dan antibakteri. Komponen VCO ini dapat berfungsi sebagai antiinflamasi, analgesic, dan antipiretik, karena kemampuannya mengurangi pembentukan transudate, pembentukan granuloma, dan aktivitas serum alkali fosfatase (Intahphuak *et al.*, 2010 dalam Novilla *et al.*, 2017). Selain itu Efek VCO sebagai antibakteri terbukti dapat menghambat bakteri seperti *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* (Silalahi *et al.*, 2014 Novilla *et al.*, 2017).

Virgin coconut oil memiliki efek antibakteri yang berasal dari kandungan senyawa aktifnya. VCO mengandung asam lemak rantai menengah yang mekanisme kerjanya merusak dinding-dinding sel bakteri (Tumbel *et al.*, 2017). Asam laurat dalam bentuk monolaurin bersifat surfaktan yang dapat mempengaruhi membran sel bakteri sehingga sifat fluiditas membran berubah. Perubahan sifat fluiditas tersebut meningkatkan daya penetrasi asam laurat masuk ke dalam sel. Asam laurat dalam sel menghambat aktivitas enzim-enzim yang berperan dalam produksi energi dan transpor nutrisi (Wang *et al.*, 1993 dalam Sulastri *et al.*, 2016). Selain itu Asam laurat mampu mengganggu aktivitas asam basa bakteri dan

meningkatkan sel T yang dapat mempercepat proses produksi antibodi. VCO mampu mengubah ekspresi beberapa gen yang berkaitan dengan respon inflamasi. Makrofag memiliki peran penting sebagai bagian dari Imunitas *innate*. Sel-sel ini memainkan peran penting dalam imunomodulasi. Selanjutnya akan mensekresi sitokin yang mengindikasikan inflamasi seperti TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 IL-10 yang disekresikan oleh monosit dan telah ditemukan untuk respon imun normal pada imunopathogenesis (Varma *et al*, 2017).

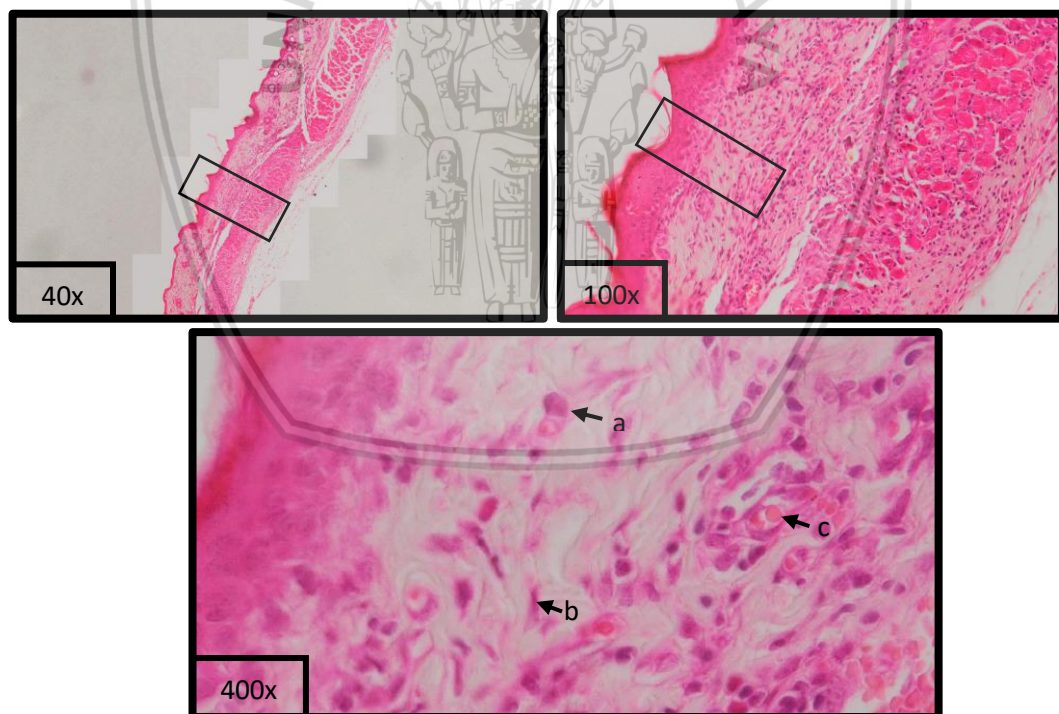
Virgin coconut oil juga mampu menghambat *histamine*, 5-HT, kinin dan prostaglandin .Terhambatnya *histamine* dapat menurunkan permeabilitas vaskuler. Sementara, kinin yang terhambat juga memberikan pengaruh dalam menurunkan permeabilitas vaskuler, vasokonstriksi, dan penurunan rasa nyeri. Terhambatnya prostaglandin menyebabkan vasokonstriksi vaskuler sehingga akan sulit dilalui oleh larutan protein yang berupa koloid. Penurunan permeabilitas tersebut menyebabkan penurunan jumlah cairan yang keluar dari pembuluh darah kapiler sehingga tidak terbentuk edema. Setelah fase inflamasi yang berlangsung lebih singkat, akan mempercepat terjadinya fase proliferasi. Saat fase proliferasi, VCO juga mampu mempercepat proliferasi sehingga fase remodeling terbentuk dan luka dapat tertutup lebih cepat.

5.2 Pengaruh Pemberian VCO Hasil Pengasaman Jeruk Nipis Terhadap Histopatologi Jaringan Kulit Sebagai Penyembuh Luka Insisi Pada Hewan Model Nosokomial oleh *Staphylococcus aureus*.

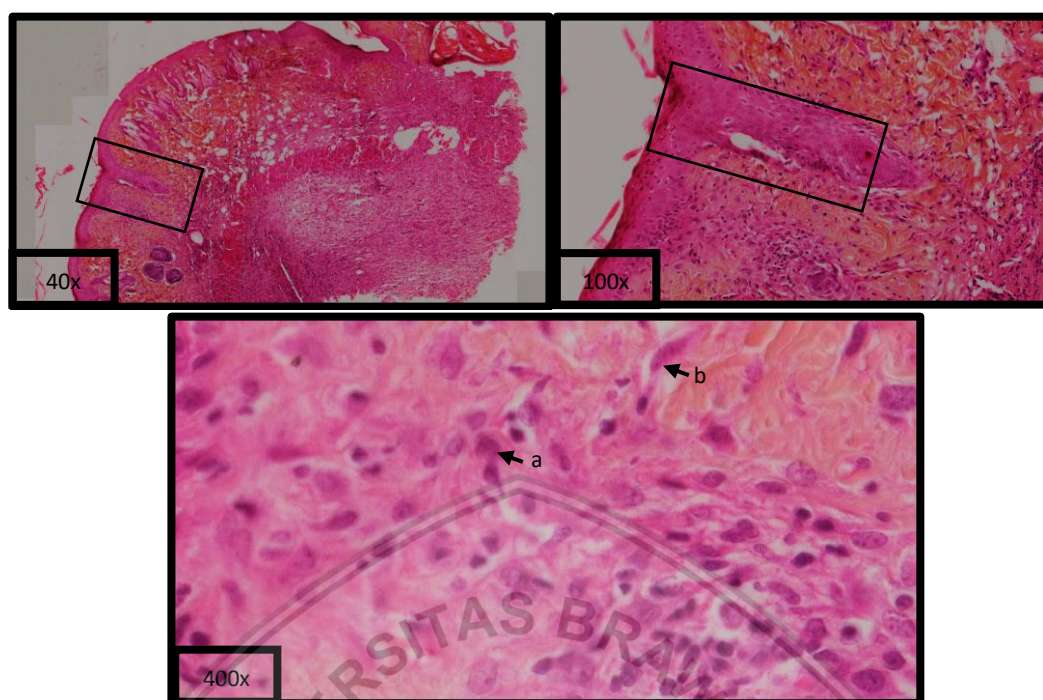
Kulit tersusun atas tiga lapisan utama yaitu epidermis, dermis dan hypodermis. Pada penelitian ini parameter yang diamati yaitu histopatologi jaringan kulit dari penyembuhan luka. Gambaran histopatologi luka diamati menggunakan

mikroskop dengan perbesaran 40x, 100x dan 400x dilihat pada **Gambar 5.3** sampai **Gambar 5.7**.

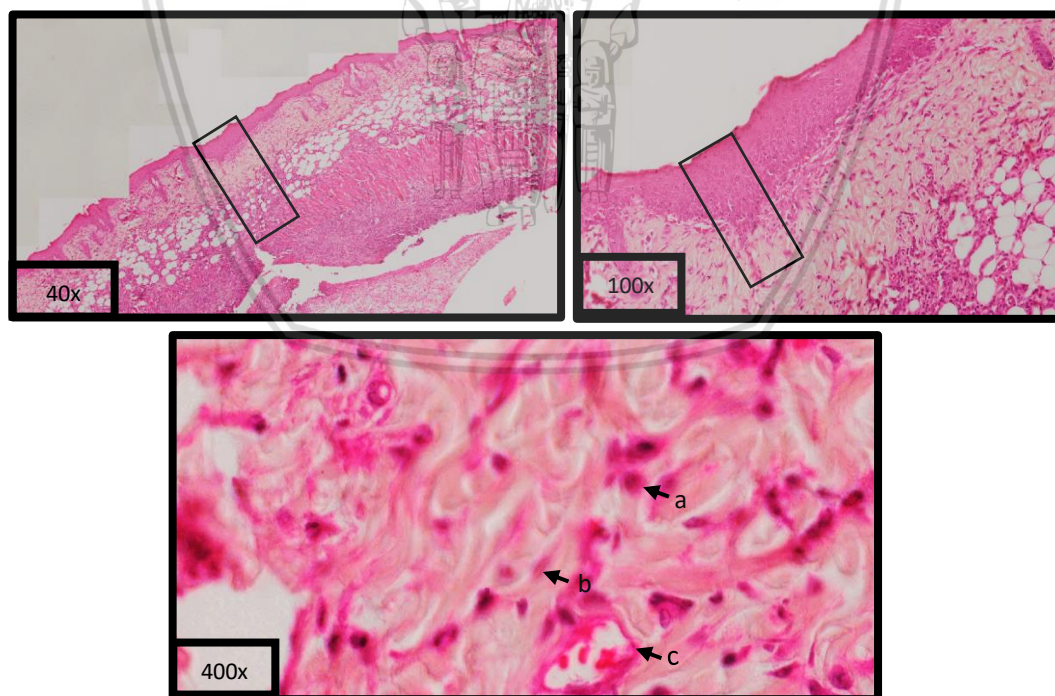
Pengamatan histopatologi jaringan kulit secara mikroskopis bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian VCO dan membandingkan antar kelompok perlakuan. Pada penelitian ini, pengamatan histopatologi dilakukan pada sekitar area luka insisi. Menurut Vidinsky *et al* (2006) daerah disekitar luka insisi terlihat seperti garis yang banyak terdapat sel radang disekitar area insisi. Pada bagian dermis tampak fibroblast yang mulai terbentuk yang tersebar secara acak dan tidak beraturan sedangkan lapisan epidermis pada daerah insisi lebih tebal jika dibandingkan kulit normal. Selain itu daerah insisi merupakan area kosong yang tidak terdapat folikel rambut (Lemo *et al* , 2010).



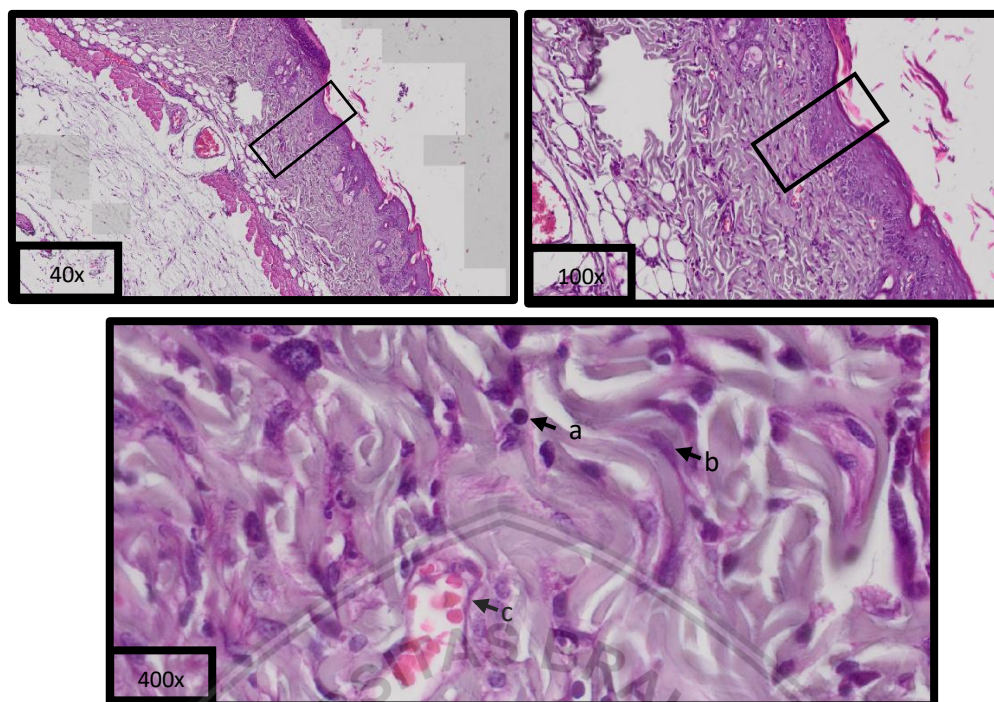
Gambar 5.3 Gambaran histopatologi luka kelompok kontrol negatif dengan pewarnaan *Hemathoxylene-Eosin* perbesaran 400x dengan menggunakan microruler dan pada perbesaran 400x terdapat infiltrasi sel radang (makrofag)(a), fibroblast (b) dan Vaskularisasi baru (c).



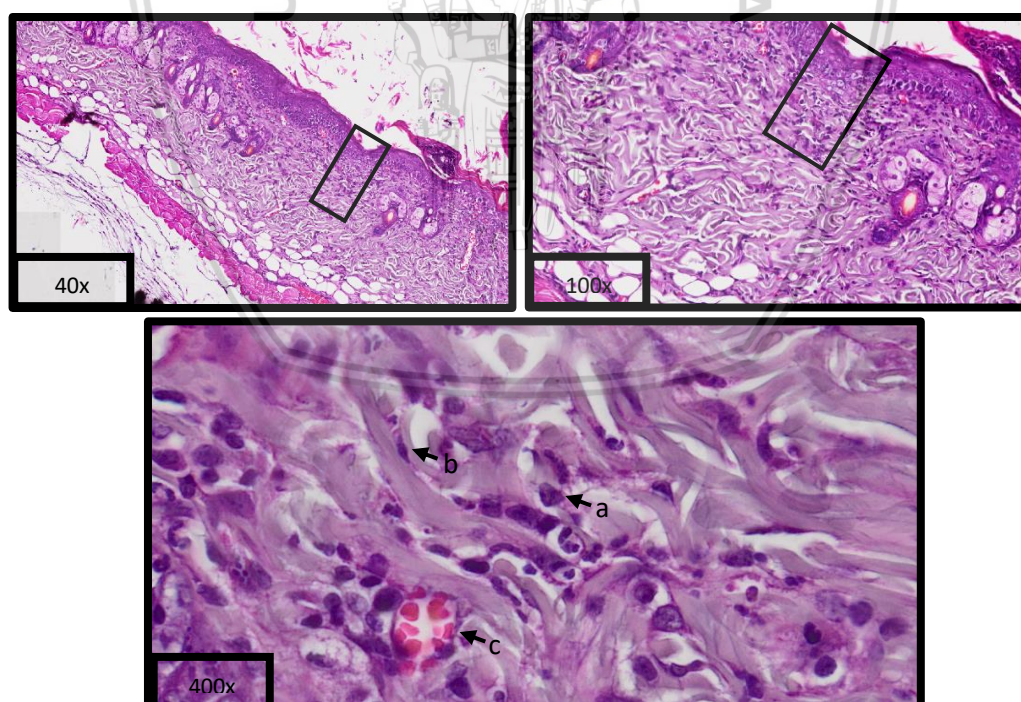
Gambar 5.4 Gambaran histopatologi luka kelompok kontrol positif dengan pewarnaan *Hemathoxylene-Eosin* perbesaran 40x, 100x, dan 400x dengan menggunakan microruler. Pada perbesaran 400x adanya infiltrasi sel radang (makrofag) yang relatif banyak (a), dan fibroblast (b).



Gambar 5.5 Gambaran histopatologi luka kelompok Terapi 1 x pemberian dengan pewarnaan *Hemathoxylene-Eosin* perbesaran 400x dengan menggunakan microruler dan pada perbesaran 400x terdapat infiltrasi sel radang berupa neutrofil (a), fibroblast (b) dan vaskularisasi baru (c) (HE, 400x).



Gambar 5.6 Gambaran histopatologi luka kelompok Terapi 2x pemberian dengan pewarnaan *Hemathoxylene-Eosin* perbesaran 40x, 100x serta 400x dengan menggunakan microruler dan pada perbesaran 400x terdapat infiltrasi sel radang (makrofag) (a), fibroblast (b) dan vaskularisasi baru (c).



Gambar 5.7 Gambaran histopatologi luka kelompok Terapi 3x pemberian dengan pewarnaan *Hemathoxylene-Eosin* perbesaran 40x, 100x serta 400x dengan menggunakan microruler dan pada perbesaran 400x terdapat sel radang (neutrofil) (a), fibroblast (b) dan vaskularisasi baru (c).

Dari hasil yang didapatkan, kelompok mencit kontrol positif K (+), kontrol negatif K (-) dan kelompok terapi 1 (1x pemberian VCO), terapi 2 (2x pemberian VCO) dan terapi 3 (3x pemberian VCO) terdapat perbedaan gambaran histopatologi jaringan kulit. Kelompok kontrol negatif menunjukkan histopatologi kulit yang telah terbentuk jaringan granulasi. Jaringan granulasi merupakan jaringan ikat muda yang mengisi daerah luka yang tersusun dari fibroblast, pembuluh darah baru dan beberapa sel inflamasi seperti makrofag.

Pada kelompok negatif (**Gambar 5.3**), dimana diberikan perlakuan standar, jumlah sel radang pada kelompok ini mengalami penurunan seiring dengan kesembuhan luka, lapisan epidermis yang mulai menebal dan adanya perbaikan pembuluh darah.

Pada kelompok kontrol positif (**Gambar 5.4**) pembentukan stratum pada epidermis belum sempurna dan masih banyak terdapat sel radang di daerah sekitar luka, ditemukan fibroblast dan kolagen yang belum memadat. Sel radang yang ditemukan menunjukkan bahwa luka pada kelompok positif masih berada pada fase inflamasi. Fase inflamasi ditandai adanya infiltrasi sel radang berupa netrofil dan makrofag, serta sel pada lapisan basal epidermis mulai berdiferensiasi.

Pada kelompok terapi 1x pemberian VCO (**Gambar 5.5**), sel radang pada kelompok terapi 1 sedikit dibanding perlakuan kelompok lain, lapisan epidermis menebal, ditemukan fibroblast yang lebih banyak dan kolagen yang mengalami pepadatan serta adanya pembuluh darah baru, yang menunjukkan fase kesembuhan luka telah memasuki fase proliferasi. Menurut Yuliani (2015) fase proliferasi ditandai dengan peningkatan jumlah fibroblast, keratinosit serta sel radang

jumlahnya semakin menurun. Pada fase ini reepitelialisasi sudah semakin sempurna dan epidermis terlihat menutup serta jaringan granulasi yang mulai terbentuk.

Pada kelompok terapi 2x (**Gambar 5.6**) pemberian VCO, sel radang pada kelompok ini sudah mengalami penurunan, lapisan epidermis mengalami penebalan, ditemukan fibroblast dan kepadatan kolagen yang mulai merapat. Fase proliferasi atau fase fibroplasia akan cepat terjadi, apabila tidak ada infeksi dan kontaminasi yang dominan pada fase inflamasi.

Pada kelompok terapi 3x pemberian (**Gambar 5.7**), sel radang pada kelompok ini sudah mengalami penurunan namun masih lebih banyak dari kelompok 1 dan 2, lapisan epidermis mengalami penebalan, ditemukan fibroblast dan kepadatan kolagen yang mulai merapat. Luka pada kelompok ini sudah memasuki fase proliferasi.

Sel radang pada daerah luka memiliki peranan sebagai pertahanan terhadap bakteri seperti *Staphylococcus aureus* yang mengontaminasi. Adanya faktor kemotaksis dapat menyebabkan sel radang seperti sel leukosit polimorfonuklear, makrofag, dan limfosit bergerak menuju luka. Hal tersebut menyebabkan jumlah sel radang di area luka yang terinfeksi mengalami peningkatan. Apabila bahan asing atau bakteri tetap pada luka, sel radang akan mengalami proliferasi dan inflamasi akut berlanjut menjadi inflamasi kronis (Pierce *et al*, 1988; Williams dan Moores, 2009).

Selama inflamasi, sinyal molekul dan *chemoattractant* seperti bradikinin, histamin, serotonin, dilepaskan oleh sel seperti sel mast, trombosit, ujung saraf, sel endotel pada daerah luka. Proses inflamasi juga dimediasi oleh makrofag sebagai respon pro inflamasi melalui pelepasan berbagai mediator kimia (seperti IL-1, IL-

8, IL-6 dan *Tumor Necrosis Factor* (TNF)). VCO memiliki kemampuan bertindak melawan molekul sinyal dan *chemoattractant* yang berumur pendek dan dilepas di tempat infeksi (Zakaria *et al*, 2011). Dengan demikian proses inflamasi dapat berlangsung lebih pendek dan sel radang mengalami penurunan. Perbedaan banyaknya gambaran sel radang terlihat pada kelompok positif dan terapi. Sel radang ditemukan terbanyak pada kelompok kontrol positif.

Reepitelisasi merupakan tahapan perbaikan yang meliputi mobilisasi, migrasi, mitosis dan diferensiasi sel epitel. Fase ini menggambarkan fase dimana luka telah ditutup oleh sel epitel. Makrofag melepaskan *epidermal growth factor* (EGF), yang menstimulasi proliferasi dan migrasi dari sel epitel. Sel epitel hanya dapat bergerak keatas jaringan aktif dan memerlukan lingkungan yang lembab. Kecepatan proses reepitelisasi ini sangat berpengaruh terhadap kecepatan kesembuhan luka karena semakin cepat proses reepitelisasi luka semakin cepat sembuh (Sastrawan *et al*, 2016).

Pembentukan epitel pada kelompok terapi berkaitan proses penyembuhan luka setelah terapi VCO. Menurut Nevin (2010) pemberian VCO dapat meningkatkan DNA jaringan granulasi dan kenaikan GAG yang berkaitan dengan sintesis matriks ekstraseluler. Selain itu asam laurat pada VCO merupakan biomolekul aktif yang dapat memodulasi proliferasi sel, signaling sel dan aktivitas *growth factor*. *Growth factor* yang berproliferasi, kemudian menstimulasi fibronectin dalam pembentukan gumpalan benang fibrin. Gumpalan benang fibrin yang terbentuk akan membentuk kerangka reepitelisasi dan proliferasi fibroblast.

Kolagen berasal dari fibroblast yang juga memproduksi matriks ekstraseluler yang biasa terlihat sebagai jaringan granulasi. Pada luka baru kolagen mulai terlihat

pada hari kedua. Kolagen merupakan serabut putih yang tidak dapat diregangkan, yang memiliki kekuatan tegangan besar. Setelah benang – benang fibrin terbentuk, kolagen dikeluarkan setelah itu proses ikatan dimulai dan proses kearah penggabungan yang kuat antara tepi – tepi luka, kekuatan tegangan luka akan terus meningkat seiring dengan maturasi kolagen (Dealey, 2012). Asam laurat pada VCO dapat menstimulasi pembentukan matriks selluler yang selanjutnya menginisiasi pembentukan kolagen pada luka. Kepadatan kolagen pada kelompok terapi menunjukan adanya penyembuhan luka yang relah terjadi.

Fibroblast dapat bermigrasi ke daerah luka yang kemudian akan mulai mensintesis matriks ekstraseluler yang secara bertahap akan digantikan oleh matriks kolagen dan berlangsung hingga 14 setelah terjadinya luka (Singer dan Clark, 1999 dalam Sastrawan, 2016). Fibroblast adalah sel utama pada fase proliferasi yang berperan dalam menyediakan matriks ekstraseluler sebagai kerangka untuk migrasi keratinosit. Tingginya jumlah rata-rata sel fibroblast menunjukkan bahwa terapi VCO yang diberikan mampu meningkatkan proses penyembuhan luka pada fase proliferasi. Peningkatan jumlah fibroblast pada kelompok terapi disebabkan karena VCO memiliki kandungan asam lemak yang merupakan molekul bioaktif dan mampu memodulasi proliferasi sel maupun *growth factor*. Jumlah fibroblast yang lebih banyak, akan menyebabkan epitelisasi yang lebih cepat.

Angiogenesis adalah proses perbaikan pembuluh darah yang sangat penting dalam pertumbuhan normal. Pada pertumbuhan neoplastik, pembentukan pembuluh darah baru berperan dalam pertumbuhan dan metastasis sel-sel neoplastik. Makrofag diketahui berperan dalam menginduksi angiogenesis dengan

cara mensekresikan beberapa faktor: tumor necrosis factor-alfa (TNF- α), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Christina *et al*, 2015). VCO memiliki kemampuan memodulasi VEGF sehingga pertumbuhan pembuluh darah baru akan berlangsung lebih dini (Ibrahm *et al*, 2017). Perbaikan pembuluh darah telah ditemukan pada semua kelompok perlakuan.

Pemberian VCO dengan intensitas dan kelembaban yang tinggi dimungkinkan dapat menurunkan kerja VCO sebagai penyembuhan luka. Selain itu pH asam pada VCO dicurigai dapat mempengaruhi kerja VCO sebagai penyembuhan luka. Menurut Keira, *et al* (2010) kestabilan pH dapat meningkatkan proliferasi dan aktivitas fibroblast. VCO hasil pengasaman jeruk nipis memiliki pH yang relatif asam yaitu 6,25. Nilai pH pada kulit normal menurut Zulkarnain, dkk (2013) berada pada kisaran pH 7. Pemberian 3x, 2x dapat menimbulkan kondisi pH kulit yang relatif tidak stabil dibandingkan 1x sehari sehingga kondisi kulit menjadi lebih asam, hal tersebut dimungkinkan sedikit dapat mengganggu proliferasi fibroblast dan berakibat pada proses penyembuhan luka. Pemberian VCO 1x sehari efektif dengan memanfaatkan VCO sebagai antibakteri. Disamping itu, VCO hasil pengasaman jeruk nipis memiliki kandungan air 0,68, sementara kadar air produk minyak kelapa murni di Indonesia berkisar antara 0,20 - 0,31 (Susanto, 2012). Adanya kadar air yang tinggi memiliki pengaruh pada kandungan kelembaban VCO. Pada dasarnya kelembaban baik untuk proses penyembuhan luka, namun disamping itu partikel- partikel kotoran akan mudah menempel.

BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah disampaikan dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Pemberian VCO hasil pengasaman jeruk nipis dengan terapi pemberian 1x, 2x, dan 3x mampu menurunkan kadar Interleukin-8 (IL-8) pada jaringan kulit mencit (*Mus musculus*) model nosokomial oleh *Staphylococcus aureus*.
2. Pemberian VCO hasil pengasaman jeruk nipis dengan terapi pemberian 1x, 2x, dan 3x mampu memperbaiki luka pada jaringan kulit mencit (*Mus musculus*) model nosokomial oleh *Staphylococcus aureus*.
3. Pemberian VCO hasil pengasaman jeruk nipis terbaik dalam menurunkan IL-8 dan memperbaiki luka pada jaringan mencit (*Mus musculus*) model infeksi nosokomial oleh *Staphylococcus aureus* adalah terapi 1x sehari.

6.2 Saran

Perlu dilakukan studi lebih lanjut serta penerapan VCO terhadap penyembuhan luka nosokomial khususnya pada pasien rumah sakit secara langsung.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, A., M.G. Jesche, dan S. Amini. 2014. Animal Models in Burn Research. *Journal PMC*, 71(17): 3241–3255.
- Akbar, B. 2010. *Tumbuhan dengan Kandungan Senyawa Aktif yang Berpotensi Sebagai Bahan Antifertilitas*. Jakarta: Adabia Press.
- Anaya, D. A dan P.E. Dellinger. 2008. *Surgical complications*. Dalam: Townsend, C.M., B.M. Evers, K. L. Maltox and R.D. Beaucamp. 2008. *Sabiston Textbook of Surgery The Biological Basis of Modern Surgical Practice*. 18thed. Philadelphia: Saunders, 328-334.
- Angel, P. G., S. Kalangi, dan S. Wangko. Gambaran Proses Radang Luka Postmortem pada Hewan Coba. *Jurnal e-Biomedik (eBM)*, 2 (3).
- Arias, K. M. 2009. *Investigasi dan Pengendalian Wabah di Fasilitas Pelayanan Kesehatan*. Jakarta : EGC.
- Arsa, M., A. A. B. Putra, E. Sahara, dan I. A. R. Asih. 2004. Pembuatan Minyak Kelapa dengan metode Fermentasi. *Udayana Mengabdi*. 3 (1) : 21-26.
- Arthur C. G. M. D. and J. E. Hall; alih bahasa, Irawati; editor Rachman L. Y. 2011. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran. Ed. 11*, Jakarta: EGC.
- Baggiolini, M dan I. C. Lewis. 1992. Interleukin-8, a Chemotactic and Inflammatory cytokine. *European Biochemical Societies*. 1(307) : 97-101.
- Bisono. 2003. *Petunjuk Praktis Operasi Kecil*. Jakarta : EGC.
- Bramson, P.H dan R. A. Wagner. 1999. *List of Anesthetic, Analgesic and Tranquilizer Drugs Frequently Used With the Common Laboratory Species*. LASEC CHUK : The Chinese University of Hongkong.
- Brown, R. G. dan T. Burn. 2005. *Lecture Notes on Dermatologi Edisi ke8*. Jakarta : Erlangga.
- Brubaker, A. I., D. F. Scheider, D. E. Faunce J K, E. J. Kovac, and J. L. Palmer. 2011. An Improved Cell Isolation Method for Flow Cytometric and Functional Analyses of Cutaneous Wound Leukocytes. *Journal Immunol Methods*. 28; 373(1-2): 161–166.
- Chandler, W. L. 2005. *Handbook of Diagnostic Hemostasis and Thrombosis Test*. University of Washington Department of Laboratory Medicine, Washington.

- Christina, B. B. H., Caroline, C. Fransisca, J. Sudiono dan K. Kristin. 2015. Peran Monosit (Makrofag) pada Proses Angiogenesis dan Fibrosis. Seminar Nasional Cendekiawan. Jakarta. 254-259.
- Chu, D. H. 2008. *Fitzpatrick 's Dermatology in General Medicine.7 th Ed* . New York: McGraw-Hill.
- Dai, T., G. B. Kharkwal, M. Tanaka, M. Hamblin and Y. Huang, V. C. B. de Arce. 2011. *Animal models of external traumatic wound infections. Virulence* 2(4): 296-315.
- Davey, P. 2005. *At Glance Medicine*. Jakarta : Erlanga.
- Dealey, C. 2012. *The Care of Wounds: A Guide for Nurse*. 4th Ed. Wiley-Blackwell. London.
- Dewandono, I D. 2014. Pemanfaatan VCO (*Virgin Coconut Oil*) dengan Teknik Massage dalam Penyembuhan Luka Dekubitus Derajat II Pada Lansia. STIKES Kusuma Husada.
- Eming, S., J. M. Davidson dan T.Krieg. 2007. Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology* 127(3) : 514-25.
- Febram, P. B., B. Ponco , dan L. Wientarsih. Aktivitas Sediaan Salep Ekstrak Batang Pohon Pisang Ambon (*Musa Paradisiaca Var Sapientum*) dalam Proses Persembuhan Luka pada Mencit (*Mus Musculus Albinus*). *Majalah Obat Tradisional*, 15(3): 121 – 137.
- Ferryansyah., R. Endriani dan T.O.R.Wahid. 2009. Pola Bakteri dan Sensitivitas Antibiotik di Kamar Operasi Bedah di Instalasi Bedah Sentral RSUD Arifin Achmad Pekanbaru. *Jurnal Ilmu Kedokteran*, 3 (2).
- Gani, N., L. I. Momuat, dan M. M. Pitoi. 2013. Profil Lipida Plasma Tikus Wistar yang Hiperkolesterolemia pada Pemberian Gedi Merah (*Abelmoschus manihot L.*). *Jurnal Mipa Unsrat Online* 2 (1) : 44-49.
- Garna, H. 2001. Patofisiologi Infeksi Bakteri pada Kulit. *Jurnal Sari Pediatri* 2 (4) : 205 – 209.
- Hartono, A. 2002. *Penyakit Bawaan Makanan*. Jakarta : EGC.
- Hasmila, I., Amallah, dan M. Danial. 2015. Efektivitas Salep Ekstrak Ekstrak Daun Sirsak (*Annonamuricata L.*) pada Mencit yang Terinfeksi Bakteri *Staphylococcus aureus*. Prosiding Seminar Nasional Mikrobiologi Kesehatan dan Lingkungan. Makasar.54-62.

- Henrich, H. 2004. *The Handbook of Experimental Animals (The Laboratory Mouse)*. USA : University of North Carolina.
- Ibrahim, A H., A. S. A. Majid, A. M. S . Majid, dan Ji, Haibo Li, S.S Al-Rawi and X. Xia. 2017. Angiogenic And Wound Healing Potency Of Fermented Virgin Coconut Oil: In Vitro And In Vivostudies. *Journal Translational Research* 9 (11):4936-4944.
- Intahphuak, S., P. Khonsung, and A.Panthong. 2010. Anti inflammatory, analgesic, and antipyretic activities of Virgin Coconut Oil. *Journal Pharmaceutical Biology*. 48 (2): 151–157.
- Iocono, J.A., B.W.Gillepe, D.G.Remick, and K.R.Colleran. 2000. Interleukin-8 Levels and Activity In Delayed-Healing Human Thermal Wounds. *Journal Wound Repair and Regeneration*, 8(3) :216-217.
- Kalangi, S. J. R. 2013. Histofisiologi Kulit. *Jurnal Biomedik (JBM)* 5 (3) : S12-20.
- Kartika, R W. 2015. Perawatan Luka Kronis dengan *Modern Dressing*. *Jurnal CDK* 7 (42) : 230.
- Keira, M. S., A. Gragnani, I. A. N. dos Santos, L. M. Ferreira. 2004. Experimental model for fibroblast culture. *SciELO*, 30: 1-16
- Khusnan, H., P. Wahyu, dan S. Mitra,. 2016. Karakterisasi Faktor-faktor Virulensi *Staphylococcus aureus* Asal Susu Kambing Peranakan Ettawa secara Fenotip dan Genotip. *JSV* 34 (1).
- Kiernan, J. A. 2008. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice* 4th ed., p: 156-58.
- King, D. 2010. *SIU SOM Gistology*. Southern Illinois University School of Medicine.
- Kobayashi, S. D., F. R. Deleo, and N. Mallachowa. 2015. Phatogenesis of *Staphylococcus aureus* Abcesses. *The American Journal of Phatology*, 185 (6).
- Kriharyani, D., E. Diah, dan E. Kurniawan. 2016. Pola Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Pada Media Agar Darah Manusia Golongan O, Ab, Dan Darah Domba Sebagai Kontrol. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kesehatan*, 3 (2): 191-200.
- Kurniawan, B., N. Carolia, dan A. Pheilia . 2014. *Antiinflammatory Effectiveness of Binahong Leaves Extracts (Anredera cordifolia (Ten.) Steenis) in Male Sprague Dawley Rats Induced by Carrageenan* . *Jurnal Kedokteran*, 4 (8):152-157.

- Kurniawati, A F S., N. Arbianti dan P. Satyabakti. 2015. Perbedaan Risiko Multidrug Resistance Organisms (MDROS) Menurut Faktor Risiko dan Kepatuhan *Hand Hygiene* . *Jurnal Berkala Epidemiologi*, 3 (3) . 277–289.
- Kusumawati, D. 2004. *Bersahabat dengan Hewan Coba*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Lemo, N., Marignac, D. M. Dohan, E. R. Gomez, and M. D Ehrenfest 2010. Cutaneous Reepithelization and Wound Contraction After Skin Biopsies in Rabbits: a Mathematical Model for Healing and Remodeling Index. *Veterinarski arhiv*. 80 (5): 637-652.
- Lostopa, I. W. F W., A. A.G. J. Wardhita, I .G. P. Pemayun dan L. M. Sudirman. 2016. Kecepatan Kesembuhan Luka Insisi Yang Diberi Amoksisilin dan Asam Mefenamat pada Tikus Putih. *Buletin Veteriner Udayana* 8 (2): 172-179.
- Mescher A. L. 2010. *Junqueira's Basic Histology Text & Atlas*. New York: McGraw Hill Medical.
- Montgomery, D., and S. Kowalsky. 2011. Design and Analysis of Experiment. John Willey an Sains Inc. ISBN 978-0-470-16990-2.
- Mufidah, Z. 2017. Jumlah Relatif Sel Neutrofil (Gr-1+) Pada Mencit (*Mus Musculus*) Terinfeksi *Staphylococcus Aureus* Setelah Pemberian Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda Citrifolia L.*). *Medical and Health Science Journal* 1 (1).
- Mufidah, Z., M. Rifai dan S. Rahayu. 2013. Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Buah Mengkudu pada Mencit yang Diinfeksi *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Veteriner* 14 (4): 501-510.
- Murti, D A., M. N. Salim dan M. Sabri. 2017. Efektifitas Salep Getah Jarak Pagar (*Jatropha Curcas L*) pada Fase Epitelisasi Penyembuhan Luka Sayat Kulit Mencit (*Mus Musculus*) dengan Pewarnaan Masson Trichrome. *JIMVET* 01(3): 465-472.
- Mustika, D. G., I. G. A. G. Pemayun dan I. M. Kardena. 2015. Efektivitas Plester Luka Pada Aplikasi Penutup Luka Insisi Pasca Operasi. *Buletin Veteriner Udayana* , 7(2): 137-145
- Nasution, L H. 2012. Infeksi Nosokomial . *Jurnal MDVI*, 39 (1) : 36-41.
- Nevin K. G, dan T. Rajamohan .2010. Effect Of Topical Application Of Virgin Coconut Oil On Skin Components And Antioxidant Status During Dermal Wound Healing In Young Rats. *Skin Pharmacol Physiol*, 23: 290-297.

- Novilla, A., P. Nursidika, dan W. Mahargyani. 2017. Komposisi Asam Lemak Minyak Kelapa Murni (*Virgin Coconut Oil*) yang Berpotensi Sebagai Anti Kandidiasis. *Jurnal Kimia dan Pendidikan*, 2 (2).
- Novriansyah, R. 2008. Perbedaan Kepadatan Kolagen di Sekitar Luka Insisi Tikus Wistar Yang Dibalut Kasa Konvensional Dan Penutup Oklusif Hidrokoloid Selama 2 Dan 14 Hari [Thesis]. Universitas Diponegoro.
- Nugraheni, R., Suhartono, dan S. Winarni. 2012. Infeksi Nosokomial di RSUD Setjonegoro Kabupaten Wonosobo. *Jurnal Media Kesehatan Masyarakat Indonesia*, 11 (1).
- Nurkusuma, D. D. 2009. Faktor yang Berpengaruh Terhadap *Kejadian Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA)* pada Kasus Infeksi Luka Pasca Operasi di Ruang Perawatan Bedah Rumah Sakit Dokter Kariadi Semarang [Thesis]. Program Pasca Sarjana Magister Ilmu Biomedik dan Pendidikan Dokter Spesialis Ilmu Bedah Universitas Diponegoro.
- Pandaleke, T A dan H. E. J Pandaleke, 2014. Etiopatogenesis Dermatitis Atopi. *Jurnal Biomedik (JBM)*, 6 (2) : 76-83.
- Pavletic, M. M. 2010. *Atlas of Small Animal Wound Management and Reconstructive Surgery*. Iowa: W.B. Saunders Company.
- Peacock, S.J., A. Justice, C. E. Moore, G. O'neil, K. Mackie, M. Kantazonu and N.P.J.Day. 2002. Virulent combinations of adhesion and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Journal Infection and immunity*, 70(9): 4987–4996.
- Pearce, E. C. 2009. *Anatomi dan Fisiologi untuk Paramedis*. Jakarta : Gramedia.
- Pierce, G F., A. Thomason, J. Reed, L.Griffin, J. Reed, R. M.Senior, T. A.Mustoe. 1988. In Vivo Incisional Wound Healing Augmented by Platelet-Derived Growth Factor and Recombinant C-Sis Gene Homodimeric Proteins. *Journal Experimental Medicine*, 167: 974-987.
- Plumb, D. C., 2008. *Plumb's Veterinary Drug Handbook 6th edition*. The IOWA State University Press. Ames.
- Potter, P.A, dan A.G. Perry. 2005. *Buku Ajar Fundamental Keperawatan : Konsep, Proses, dan Praktik. Edisi 4*. Alih Bahasa : Renata Komalasari,dkk. Jakarta: EGC.
- Prabakti, Y. 2005. Perbedaan Jumlah Fibroblas di Sekitar Luka Insisi pada Tikus yang diberi Infiltrasi Penghilang Nyeri Levobupivakain dan yang tidak diberi Levobupivakain [Thesis]. Program Pascasarjana dan Program pendidikan Dokter Spesialis I Anestesiologi Univeritas Diponegoro Semarang.

- Pratiwi, H. C dan A. Manan. 2015. Teknik Dasar Histologi pada Ikan Gurami (*Osphronemus Gouramy*). *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 7(2). Universitas Airlangga.
- Pulung, M L., F.R.D Sianipar dan R. Yogaswara. 2016. Potensi Antioksidan dan Antibakteri *Virgin Coconut Oil* dari Tanaman Asal Papua. *Jurnal Chemistry UNP*, 9 (2).
- Purnama, H., S. Sriwidodo dan S. R.Mita. 2017. Review Sistematis: Proses Penyembuhan dan Perawatan Luka. *Jurnal Farmaka*, 15 (2).
- Purnasari, P. W., D. Fatmawati, dan I. Yusuf. 2012. Pengaruh Lendir Bekicot (*Achatina fulica*) terhadap Jumlah Sel Fibroblas pada Penyembuhan Luka Sayat. *Sains Medika* 4(2) : 195-203.
- Qosimah, D. 2017. *Proses Produksi Virgin Coconut Oil (VCO) Menggunakan Variasi Keasaman Jeruk*. Seminar Temu Nasional Inovasi Pengelolaan, Pemanfaatan, dan Festival Sumber Genetik Lokal. Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Jawa Timur.
- Rahmaniar, R P. 2017. Uji Sensitivitas Isolat *Staphylococcus Aureus* Patogen Pada Anjing Terhadap Beberapa Antibiotik. *Jurnal Agroveteriner*, 5 (2).
- Rahmawati, I. 2014. Perbedaan Efek Perawatan Luka Menggunakan Gerusan Daun Petai Cina (*Leucaena Glauca*, *Benth*) Dan Povidon Iodine 10 % Dalam Mempercepat Penyembuhan Luka Bersih Padamarmut (*Cavia Porcellus*). *Jurnal Wiyata*, 1(2).
- Rakhmadi, I., H. C. H Siregar, Muladno dan P. H Siagian. Performa Mencit Jantan (*Mus Musculus*) Umur 28-63 Hari pada Alas Kandang Sekam, Pasir Dan Zeolit Dengan Dan Tanpa Sekat Alas. *Jurnal Zeolit Indonesia*, 8 (2).
- Rubenstein, D., J. Bradley, dan W. David. 2005. *Lecture Notes Kedokteran Klinis*. Jakarta : Erlangga.
- Rupina, W., H. F. Trianto, dan I. Fitrianingrum. 2016. Efek Salep Ekstrak 70 % Daun Karamunting terhadap Re-epitelisasi Luka Insisi Kulit Tikus Wistar. Universitas Tanjungpura. *Elektronik Jurnal Kedokteran Indonesia*, 4 (1).
- Sabarguna, B.S. 2007 Sistem Informasi Manajemen Rumah Sakit. Yogyakarta: Konsorsium Rumah sakit Islam Jateng-DIY.
- Salsabila, M. 2016. Pembuatan Minyak Kelapa dengan Pengasaman (Jeruk Nipis) dan Penetralkan dengan NaHCO_3 beserta Uji Kualitasnya [Skripsi]. FMIPA. UNNES.

- Sastrawan, N K. L, A. A. G. J. Wardhita, I. A. Dada, dan L. M. Sudimartini. 2016. Perbandingan Kecepatan Kesembuhan Luka Insisi yang Diberi Amoksisilin-Deksametason dan Amoksisilin-Asam Mefenamat pada Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*). *Indonesia Medicus Veterinus*. 5(2) : 129-144.
- Smeltzer dan Bare. 2002. *Keperawatan Medikal Bedah*. EGC, Jakarta.
- Soedarto. 2016. *Infeksi Nosokomial di Rumah Sakit*. Jakarta : Sagungseto.
- Srivastava, Y., A.D. Semval, G K. Sharma. 2013. Studies on Storage Stability of Hot Extracted (HEVCO) and Cold Extracted Virgin Coconut Oil (CEVCO) in Different Flexible and Rigid Packaging System. *International Food Research Journal* 20 (4).
- Suharto, I P S. 2017. Effect of Giving Mahkota Dewa Fruits (*Phaleria Macrocarpa*) Extract to Epithelialization In Incision Wound of White Rats (*Rattus Norvegicus*) . *Jurnal Ilmiah Keperawatan Universitas Kadiri*.
- Sulastrri, E., A. K. Sari dan Mappiratu. 2016. Uji Aktivitas Antibakteri Krim Asam Laurat Terhadap *Staphylococcus Aureus* ATCC 25923 dan *Pseudomonas Aeruginosa* ATCC 27853. *Journal of Pharmacy* 2 (2):59-67.
- Sumbayak, E. M. 2016. Fibroblas: Struktur dan Peranannya dalam Penyembuhan Luka. *Jurnal Histologi FK UKRIDA*.
- Sun, B. K., P. A. Khavari dan Z. Siprashvili. 2014. Advances in Skin Grafting and Treatment Of Cutaneous Wounds. *Journal Science*, 346 : 941-945.
- Supriyanto dan L. A. I. Luviana. 2010. Pengaruh Pemberian Getah Tanaman Patah Tulang Secara Topikal Terhadap Gambaran Histopatologis dan Ketebalan Lapisan Keratin Kulit. Seminar Nasional Pendidikan Biologi FKIP UNS, 7(1).
- Suroto. 2001. Peran Sitokin IL-1 beta, TNF alfa, IL-8, IL-4 dan TGF Beta-1 Pada Stroke Iskemik.[Disertasi]. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga.
- Susanto, T. 2012. Kajian Metode Pengasaman dalam Proses Produksi Minyak Kelapa Ditinjau Dari Mutu Produk Dan Komposisi Asam Amino Blonde. *Jurnal Dinamika Penelitian Industri*, 23(2): 124-130.
- Susilowati. 2009. Pembuatan Virgin Coconut Oil dengan Metode Penggaraman. *Jurnal Teknik Kimia*, 3 (2).
- Suwiti, N. K. 2010. Deteksi Histologik Kesembuhan Luka pada Kulit Pasca Pemberian Daun Mengkudu (*Morinda Citrofilia* Linn). *Buletin Veteriner Udayana*, 2 (1). :1-9.

- Triyono, B. 2005. Perbedaan Tampilan Kolagen di Sekitar Luka Insisi pada Tikus Wistar yang diberi Infiltrasi Penghilang Nyeri Levobupivakain dan yang Tidak diberi *Levobupivakain* [Thesis]. Semarang : Universitas Diponegoro.
- Tumbel, L K., P. M. Wowor, dan K. V. Siagian. 2017. Uji Daya Hambat Minyak Kelapa Murni (Virgin Coconut Oil) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Enterococcus Faecalis*. *Jurnal e-GiGi (eG)*, 5 (1).
- Turner, M. D., B. Nejdai, and D. J Penington. 2014. Cytokines and Chemokines : At the Crossroads of Cell Signaling and Inflammatory Disease. *Biochim biopsy*, 1843(11).
- Ukrowi, U. 2011. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Umbi Bidara Upas (*Merremia Mammosa*) terhadap Fagositosis Makrofag dan Produksi Nitrit Oksida (No) Makrofag [Thesis]. Semarang : Universitas Diponegoro.
- Varma, S R., I. Arumugam, K.B. Pavan, M. Rafiq, M. Raghuraman, N. Dilip, R. Paramesh, and T. O. Sivaprakasam. 2017. In Vitro Anti-Inflammatory And Skin Protective Properties Of Virgin Coconut Oil. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 30: 1-10.
- Vidinsky, B., F. Longauer, J. Sabo, L. Lenhardt, N. Bobrov, P. Gal, T. Toporcer. 2006. Histological Study of the First Seven Days of Skin Wound Healing in Rat. *Acta Veterinaria Brno*. 75: 197-202.
- Warbung, Y. Y., J. Possangi , dan V.N. S. Wowor. 2013. Daya Hambat Ekstrak Spons Laut *Callyspongia* sp terhadap Pertubuhan Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Jurnal e- Gigi*, 1 (2).
- Werner S G. R. 2003. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiology Review* 83.
- Widati, A. S., Mustakim, dan S. Indriana. 2007. Pengaruh Lama Pengapuran Terhadap Kadar Air, Kadar Protein, Kadar Kalsium, Daya Kembang dan Mutu Organoleptik Kerupuk Rambak Kulit Sapi. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Hasil Ternak*, 2 (1).
- Widiandani, T., B. T. Purwanto, N.W. Diyah, R. Susilowaty dan S. Harjono. 2010. Upaya Peningkatan Kualitas Minyak Kelapa yang dibuat dari *Cocos Nucifera L* dengan Berbagai Metode Kimiawi dan Fisik. *Jurnal Ilmiah Kimia Farmasi Universitas Airlangga* 1 (1).
- Wikansari, N., B. Raharjo, dan R. Hertiningsih. 2012. Pemeriksaan Total Kuman Udara dan *Staphylococcus Aureus* di Ruang Rawat Inap Rumah Sakit X Kota Semarang. *Jurnal Kesehatan Masyarakat FKM UNDIP*, 1 (2) :384-392.

- Williams, J. W. dan A. Moores. 2009. *BSAVA Manual of Canine and Feline Wound Management and Reconstruction*. London: BSAVA.
- Yuliani, N. S, dan V. Lenda. 2015. Pengaruh Ekstrak Daun C.Odorata Terhadap Proses Kesembuhan Luka Insisi Pada Tikus Sprague-Dawley. *Jurnal Kajian Veteriner*, 3(2) : 93-99.
- Yunanda, V dan T. Rinanda. 2016. Aktivitas Penyembuhan Luka Sediaan Topikal Ekstrak Bawang Merah (*Allium cepa*) terhadap Luka Sayat Kulit Mencit (*Mus Musculus*). *Jurnal Veteriner*, 17 (4): 606-614.
- Zakaria, Z. A., A. M. M. Jais, K. Long, and M.Z. Salleh. 2011. In vivo Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of Dried and Fermented Processed Virgin Coconut Oil. *Medical Principle Practice*. 20:231–236.
- Zulkarnain, A. K., N. Ernawati dan N.I. Sukardani. Aktivitas Amilum Bengkuang (*Pachyrrizus Erosus*(L.) Urban) Sebagai Tabir Surya Pada Mencit Dan Pengaruh Kenaikan Kadarnya Terhadap Viskositas Sediaan. *Traditional Medicine Journal*, 18(1).

